Untersuchungen zur Strukturabhängigkeit der pharmakologischen Wirkung organischer Nitrate auf subzellulärer Ebene

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

HENNING SCHRÖDER

aus Remscheid

Düsseldorf 1985

Untersuchungen zur Strukturabhängigkeit der pharmakologischen Wirkung organischer Nitrate auf subzellulärer Ebene

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

HENNING SCHRÖDER

aus Remscheid

Düsseldorf 1985

1. Gutachter: Prof. Dr. Eike Noack
2. Gutachter: Prof. Dr. Günter Willuhn

Tag der mündlichen Prüfung: 4. November 1985

Meinen Eltern

Die Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit wurden auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Eike Noack am Institut für Pharmakologie der Universität Düsseldorf durchgeführt.

Meinem Doktorvater,
Herrn Professor Dr. Eike Noack, danke ich sehr herzlich für das fördernde Interesse, das er meiner Arbeit und mir jederzeit entgegenbrachte, das Vertrauen, die stete Bereitschaft zu kritischen, anregenden und wertvollen Dikussionen, seine Fähigkeit, in allen Situationen Zuversicht und gute Laune auszustrahlen sowie für seine zu jeder Zeit gewährte freundliche und großzügige Unterstützung.

Dem Leiter der Abteilung Pharmakokinetik der Pharma Schwarz GmbH, Herrn Dr. Rainer Bonn, danke ich für die zeitweise Arbeitsmöglichkeit in seinem Labor und der Überlassung einer HPLC-Apparatur für meine Untersuchungen.

ABKÜRZUNGEN

cAMP	cyclisches Adenosin-3':5'-monophosphat
cGMP	cyclisches Guanosin-3':5'-monophosphat
Cys, Cystein	L-Cystein
DTT	Dithiothreitol
EC_{50}	Halbmaximale Wirkkonzentration
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EGTA	Bis-(aminoethyl)-glycolether-N,N,N',N',-tetra-essigsäure
ETN	Erythrittetranitrat
GC	Guanylatcyclase
1,2-GDN	1,2-Glycerindinitrat
1,3-GDN	1,3-Glycerindinitrat
1-GMN	1-Glycerinmononitrat
GTN	(Glycerintrinitrat) Nitroglycerin
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
IBMX	1-Isobutyl-3-methylxanthin
IIDN	Isoididdinitrat
II-2-N	Isoidid-2-Nitrat
IMDN	Isomanniddinitrat
IM-2-N	Isomannid-2-Nitrat
ISDN	Isosorbiddinitrat
IS-2-Ac-5-N	Isosorbid-2-Acetat-5-Nitrat
IS-5-Ac-2-N	Isosorbid-5-Acetat-2-Nitrat
IS-2-N	Isosorbid-2-Nitrat
IS-5-N	Isosorbid-5-Nitrat
NO	Stickoxid
NPN	Nitroprussidnatrium
PDE	Phosphodiesterase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

- -

Die untersuchten antianginös wirksamen Substanzen vom Typ der Salpetersäureester werden im folgenden als "organische Nitrate" oder "Nitrate" bezeichnet. Diese Benennung ist chemisch nicht exakt, entspricht aber dem allgemeinen medizinisch-pharmakologischen Sprachgebrauch.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A	EINLEITUNG	6
A 1	Die Guanylatcyclase (GC) als Wirkort der organischen Nitrate	6
A 1.1	Eigenschaften und Gewebeverteilung der GC	6
A 1.2	Aktivierung der GC durch Hormone	7
A 1.3	Aktivierung der GC durch nicht hormonelle Faktoren	8
A 1.4	Die GC als Vermittler der Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur	8
A 1.5	Die Rolle des Endothels, der Proteinkinasen und der Ca^{2+}-ATPase bei der gefäß-dilatierenden Wirkung des cGMP	9
A 2	Bisherige Erkenntnisse zum molekularen Mechanismus der GC-Aktivierung	11
A 2.1	Lokalisierung des Aktivierungsprozesses im Zellinneren	11
A 2.2	Einfluß von Cystein und anderen Thiolen auf die GC-Aktivierung	12
A 2.3	Nitrosothiole und Nitroso-Hämkomplexe als mögliche Mediatoren der GC-Aktivierung durch organische Nitrate	12
B	PROBLEMSTELLUNG	14
B 1	Frage nach der Strukturabhängigkeit der GC-Aktivierung durch organische Nitrate	14
B 2	Frage nach einer Beziehung zwischen Nitratabbau (NO-Freisetzung) und GC-Aktivierung	14
B 3	Präsentation der untersuchten Verbindungen	15
B 3.1	Aliphatische Verbindungen (Alditnitrate)	15
B 3.2	Cyclische Verbindungen (1,4:3,6-Dianhydro-hexitnitrate)	16
B 3.3	Derivate	18

		Seite
C	METHODEN (EXPERIMENTELLER TEIL)	21
C 1	Aufbau einer geeigneten Methode zur Erstellung reproduzierbarer Konzentrations-Wirkungskurven von organischen Nitraten an der GC	21
C 1.1	Präparation	21
C 1.1.1	Präparation der GC aus Rattenleber zur Stimulierung mit Natriumazid	21
C 1.1.2	Präparation der GC aus Rattenleber zur Stimulierung mit organischen Nitraten	22
C 1.1.2.1	Wahl einer geeigneten Lagerung des Enzyms	22
C 1.1.3	Präparation mit Reinigung der GC zur Erhöhung der Enzymsensibilität	24
C 1.1.3.1	Perfusion der Rattenleber in situ	24
C 1.1.3.2	Präparation	26
C 1.1.3.3	Dialyse	27
C 1.1.4	Präparation der GC aus Schweinecarotiden	28
C 1.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	29
C 1.3	GC-Test	31
C 1.4	Bestimmung von cGMP	33
C 1.4.1	Meßprinzip des Radioimmunoassays	33
C 1.4.2	Aufarbeitung der Proben	34
C 1.4.3	Messung der Radioaktivität durch Szintillationsspektrometrie	34
C 1.4.4	Rechnerische Auswertung	36
C 1.4.5	Kreuzreaktivität mit GTP	38
C 1.4.6	pH-Abhängigkeit des RIA	40
C 2	Messung des Nitratabbaus mittels HPLC	41
C 2.1	Aufarbeitung der Proben	41
C 2.2	HPLC-Trennung und rechnerische Auswertung	42
C 3	Statistische Methoden	45
C 4	Reagenzien	46

		Seite
D	ERGEBNISSE - (Theoretischer Teil)	47
D 1	GC-Aktivierung durch Natriumazid	47
D 2	GC-Aktivierung durch organische Nitrate in Gegenwart von Cystein	47
D 3	GC-Aktivierung durch organische Nitrate in Abwesenheit von Cystein	51
D 4	Einfluß von PDE-Hemmern auf die GC-Aktivität	53
D 5	Einfluß der Proteinkonzentration auf die GC-Aktivität	56
D 6	Einfluß des Kofaktors (Mn^{2+}/Mg^{2+}) auf die GC-Aktivität	57
D 7	Einfluß des GTP-regenerierenden Systems auf die GC-Aktivität und die nichtenzymatische cGMP-Bildung	58
D 8	Einfluß von Lösungsmitteln auf die GC-Aktivität	59
D 9	Konzentrations-Wirkungskurven der organischen Nitrate an der GC aus Rattenleber	60
D 9.1	ETN, GTN, ISDN, IS-5-N - Einfluß der Nitratgruppenanzahl	61
D 9.2	IMDN, IIDN, ISDN - Einfluß sterischer Faktoren bei den Dinitraten	64
D 9.3	II-2-N, IS-2-N, IM-2-N, IS-5-N - Einfluß sterischer Faktoren bei den Mononitraten	66
D 9.4	Essigsäureester von IS-5-N und IS-2-N - Einfluß der Lipophilie	68
D 9.5	Pivalin- und Isovaleriansäureester von IS-5-N - Einfluß von Lipophilie und sterischen Faktoren	70
D 10	Konzentration-Wirkungskurven von GTN, ISDN und IS-5-N an der GC aus Schweinecarotiden	72
D 11	Einfluß von EGTA auf die Stimulierbarkeit der GC	75
D 12	Gegenüberstellung des Wirkprofils der organischen Nitrate an der GC und am Langendorff-Herzen - unterschiedlicher Einfluß von Lipophilie und sterischen Faktoren	78

		Seite
D 13	Einfluß unterschiedlicher Thiole auf den Nitratabbau und die Aktivierung der GC	81
D 13.1	Abbau von GTN und gleichzeitige Aktivierung der GC in Gegenwart von Cystein, Cysteinderivaten und anderen Thiolen	81
D 13.1.1	Enzymatischer Abbau von GTN - Bedeutung der SH-Gruppe	85
D 13.1.2	Einfluß der Chiralität	87
D 13.1.3	Bedeutung der Carboxylgruppe	88
D 13.1.4	Bedeutung der Aminogruppe	89
D 13.1.5	Thiole mit stereochemisch variierten Amino- und Carboxylgruppen	91
D 14	Zeitkinetik des Abbaus von GTN in Gegenwart von Cystein	92
D 15	Kinetik des GTN-Abbaus in Abhängigkeit von der Cysteinkonzentration	96
D 16	Aktivierung der GC durch GTN in Abhängigkeit von der Cysteinkonzentration - Beziehung zum cysteinabhängigen GTN-Abbau	97
D 17	GC-Aktivität bei gleichzeitiger Gegenwart von GSH und Ascorbinsäure	98
D 18	GC-Aktivität bei gleichzeitiger Gegenwart von GSH und katalytischen Mengen Cystein	100
D 19	GC-Aktivität bei gleichzeitiger Gegenwart von Cystein und Homocystein	101
D 20	Abbau verschiedener organischer Nitrate in Gegenwart von Cystein	102
D 21	Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten	103
D 22	Berechnung der freigesetzten NO-Menge aus dem Nitratabbau	104
D 23	Korrelation zwischen cysteininduzierter NO-Freisetzung und GC-Aktivierung	106
D 24	Abbau verschiedener organischer Nitrate bei gleichzeitiger Gegenwart von Cystein und GC-Fraktion	108

		Seite
E	DISKUSSION	112
F	ZUSAMMENFASSUNG	127
G	LITERATURVERZEICHNIS	130

A EINLEITUNG

A 1 Die GC als Wirkort der organischen Nitrate

A 1.1 Eigenschaften und Gewebeverteilung der GC

Organische Nitrate wirken auf subzellulärer Ebene über eine Stimulierung des Enzyms Guanylatcyclase (GC) (E.C. 4.6.1.2.) (5). Dieses Enzym ist verantwortlich für die Bildung von cGMP (cyclisches Guanosin-3':5'-monophosphat) aus GTP (Guanosin-5'-triphosphat). Der stereochemische Verlauf dieser Reaktion konnte kürzlich geklärt werden und entspricht dem der Adenylatcyclase (81). cGMP wurde 1963 von Ashman et al. in Rättenurin entdeckt (2); ihre Arbeit lieferte den ersten Beweis für die Existenz dieses Nukleotids neben dem damals bereits bekannten cAMP in biologischen Systemen. 1969 erschienen die ersten Veröffentlichungen über die GC (29, 43, 85). In ihnen wurde die Umwandlung von GTP in ungereinigten Gewebehomogenaten beschrieben. White und Aurbach (98) fanden bei der Ratte unterschiedliche GC-Aktivitäten in Lunge, Gehirn, Niere, Leber und Herz. Erschwert wurden diese Untersuchungen durch die im Vergleich zu cAMP viel niedrigeren Gewebespiegel des cGMP und die relativ zeitaufwendigen und unempfindlichen Analysenmethoden. Fortschritte im Bereich der Szintillationsspektrometrie und insbesondere die von Steiner et al. (87) entwickelte und von Harper et al. (30) in ihrer Empfindlichkeit verbesserte, radioimmunologische Methode zur Bestimmung cyclischer Nukleotide haben in den letzten 10-15 Jahren den Kenntnisstand wesentlich erhöht.

Die GC konnte in fast allen tierischen Geweben nachgewiesen werden, wo sie in den meisten Fällen sowohl im Cytoplasma gelöst als auch strukturgebunden auftritt.

Das Molekulargewicht für das lösliche Enzym aus Säugetiergewebe wird von den meisten Autoren mit 150.000 bis 200.000 d angegeben (8, 64, 65, 66, 70). Bei der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich die aus Rattenleber gewonnene und gereinigte GC verwandt. Braughler

et al. (10) untersuchten eine hochgereinigte Enzymfraktion aus diesem Gewebe und fanden ein Molekulargewicht von 150.000 d bei einem Stokeschen Radius von 35 Å. Das Holoenzym ist ein Dimer und besteht aus 2 etwa gleich großen Untereinheiten, deren Molekulargewicht mit 72.000 d angegeben wird (8).

A 1.2 Aktivierung der GC durch Hormone

Hormone und andere Agenzien, die die cAMP-Bildung in intakten Zellsystemen erhöhen, sind mit einigen wenigen Ausnahmen auch in der Lage, die in zellfreien Präparationen isolierte Adenylatcyclase zu stimulieren. Bei der GC ist dies nicht der Fall. Obwohl zahlreiche hormonelle Faktoren, wie cholinerge und $alpha_1$-adrenerge Agonisten gefunden wurden, die die cGMP-Spiegel erhöhen (6, 25, 64) konnte in keinem Fall ein überzeugender stimulierender Effekt dieser Substanzen auf zellfreie GC-Präparationen nachgewiesen werden. In jüngster Zeit gelang der Arbeitsgruppe um Ferid Murad der Nachweis, daß die isolierte, strukturgebundene GC durch den natriuretischen Faktor (ANF) aktiviert werden kann, der gleichzeitig am aufgespannten Aortenstreifen eine Erhöhung der cGMP-Spiegel und eine Gefäßrelaxation hervorruft (94, 99).

Obwohl die Basalaktivität in vitro nur etwa um das Dreifache erhöht werden konnte, ist damit zum ersten Mal für eine physiologische Substanz mit Hormoncharakter die Wirksamkeit auch an einer zellfreien GC-Präparation sichergestellt worden. Hormonelle Effekte auf die cGMP-Bildung stellt man sich heute als das Resultat einer Sequenz von rezeptorvermittelten Reaktionen vor, die durch eine Zerstörung der Zelle unterbrochen wird. Der präzise Mechanismus der Stimulierung durch hormonelle Faktoren und auch die physiologische Bedeutung des dabei gebildeten cGMP sind jedoch noch weitgehend ungeklärt.

A 1.3 Aktivierung der GC durch nicht hormonelle Faktoren

Neben den erwähnten Hormonen gibt es eine Vielzahl von nicht hormonellen Verbindungen, die die cGMP-Bildung beeinflussen (5, 45, 67). Bis auf einige wenige Ausnahmen beeinflussen diese Substanzen die Entstehung von cGMP über einen direkten Angriff an der GC. Ihre Wirksamkeit ist nicht auf intakte Zellen beschränkt, sondern erstreckt sich auch auf zellfreie GC-Präparationen. Zu diesen Verbindungen gehören: Sulfhydrylreagenzien wie Diamid und N-Ethylmaleinimid, Verbindungen mit SH-Gruppen wie Cystein, Verbindungen wie Ascorbinsäure oder Methylenblau, Fettsäuren und ihre Peroxide, Sauerstoff und reaktive Sauerstoffabkömmlinge wie das Hydroxylradikal, Ionen aus der Gruppe der Übergangsmetalle wie Mangan und schließlich Verbindungen, die eine NO-Gruppierung enthalten wie Nitroprussidnatrium (NPN), Natriumnitrit, Stickstoffmonoxid und die organischen Nitrate. Auch stickstoffhaltige Verbindungen, die zu NO aufoxidiert werden können, wie z.B. Natriumazid (45) können die GC stimulieren. Kürzlich konnte für Cyanidionen eine Hemmung der durch NPN hervorgerufenen Gefäßrelaxation und cGMP-Akkumulierung nachgewiesen werden (79). Allen diesen Verbindungen ist die Eigenschaft, an Redoxprozessen teilzunehmen, gemeinsam. In der Tat deutet vieles darauf hin, daß bei der Regulation der GC-Aktivität Redoxprozesse eine wichtige Rolle spielen (26, 27).

A 1.4 Die GC als Vermittler der Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur

Die früh aufgestellte Hypothese, daß cGMP eine Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur bewirkt, beruhte auf der Tatsache, daß Agenzien, die bestimmte Gefäßmuskelarten kontrahieren, wie z.B. Acetylcholin, auch die Gewebespiegel von cGMP erhöhen (15, 54). Dieser Effekt wurde mit dem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in Zusammenhang gebracht (90), wobei es

sich aber nur um eine indirekte Beeinflussung handeln konnte, da physiologische Konzentrationen von Ca^{2+} die GC-Stimulierung in vitro hemmen (28, 89). Eine Stimulierung der zellfreien GC-Präparation mit Acetylcholin in vitro gelang nicht (25). Kukovetz et al. (49) konnten zeigen, daß die im Verlauf der Muskelkontraktion auftretende Erhöhung des cGMP-Spiegels im Sinne eines physiologischen negativen Rückkopplungssignals für eine Begrenzung und Umkehrung der kontraktilen Effekte von Acetylcholin verantwortlich ist, d.h. in Wahrheit muskelrelaxierende Wirkung hat. Dies konnte auch durch direkte Untersuchungen der muskelrelaxierenden Wirksamkeit von cGMP und 8-Bromo-cGMP sichergestellt werden (28, 52, 68). Das lipophilere Bromderivat besitzt aufgrund seiner besseren Penetration zum Wirkort eine wesentlich größere Wirksamkeit.

Muskelrelaxantien wie NPN, Natriumnitrit, GTN und der Hauptmetabolit des Molsidomins SIN-1 (5, 71) bewirken sowohl eine Erhöhung des cGMP-Spiegels in der glatten Gefäßmuskulatur als auch eine Stimulierung der GC in vitro. Das gebildete cGMP führt zu einer konzentrationsabhängigen Relaxation und vermittelt so die hämodynamische Wirkung der oben beschriebenen Substanzen (50). Dabei eilt die intrazelluläre Erhöhung des cGMP-Spiegels, wie dies bei einer kausalen Verknüpfung der Prozesse zu fordern ist, der gefäßerschlaffenden Wirkung zeitlich voraus.

A 1.5 Bedeutung von Endothel, Proteinkinasen und der Ca^{2+}-ATPase bei der gefäßdilatierenden Wirkung des cGMP

Über die weiteren Reaktionen des cGMP auf molekularer Ebene bis hin zur Gefäßerweiterung herrscht noch keine endgültige Klarheit, obwohl es in neuerer Zeit Hinweise auf eine Beteiligung des Endothels und der Ca^{2+}-ATPase gegeben hat:

Furchgott und Mitarbeiter untersuchten als erste die Rolle des Endothels bei der durch Acetylcholin induzierten Gefäßrelaxation (20). Seitdem konnte für die gefäßrelaxierende Wirkung einer Vielzahl von Hormonen und anderen Substanzen eine Abhängigkeit vom Vorhandensein eines intakten Endothels nachgewiesen werden (78). Das Endothel produziert dabei eine Überträgersubstanz, den sog. "endothelium derived relaxing factor" (EDRF), der wiederum nach der Permeation in die glatte Gefäßmuskelzelle eine Serie von biochemischen Prozessen in Gang setzt, an deren Ende die Relaxation des Gefäßes steht. Mülsch und Mitarbeiter konnten zeigen, daß EDRF in der Lage ist, die lösliche GC zu aktivieren (63). Ein umfassendes Modell zur Gefäßrelaxation wurde von Rapoport und Mitarbeitern entwickelt (77). Darin vermittelt die GC die gefäßrelaxierende Wirkung sowohl der endothelabhängigen Verbindungen als auch der endothelunabhängigen Nitrovasodilatantien (NPN, organische Nitrate). Die Nitrokörper können die GC unter Umgehung des EDRF-Systems stimulieren, da aus ihnen das aufgrund seines radikalischen Charakters direkt wirksame NO freigesetzt werden kann. Die endothelabhängigen Vasodilatantien induzieren über eine rezeptorvermittelte Reaktion an der Endothelmembran die Umwandlung von Phospholipiden in oxidierte Fettsäuren, die ihrerseits nach der Permeation in die Muskelzelle Radikale freisetzen. Für solche Substanzen, wie z.B. das Hydroxylradikal, ist ein GC-stimulierender Effekt nachgewiesen (62). Das so gebildete cGMP aktiviert cGMP-abhängige Proteinkinasen (18, 96), wodurch letztlich ein verminderter Phosphorylierungsgrad des Myosins (leichte Kette) und die Gefäßrelaxation hervorgerufen werden soll.

In jüngster Zeit konnte durch Popescu und Mitarbeiter (76) auch der Nachweis einer Verminderung der intrazellulären Calciumkonzentration durch cGMP erbracht werden. Dies ist von besonderer Bedeutung, da den Calciumionen bei der Regulation des Gefäßtonus eine Schlüsselfunktion zukommt. cGMP aktiviert die sarkolemmale cGMP-abhängige Proteinkinase. Dieses Enzym phosphoryliert die ebenfalls in der glattmuskulären Zellmembran lokalisierte Ca^{2+}-ATPase, was einen erhöhten Austritt von Calciumionen in den Extrazellulärraum und die Erschlaffung der Myofibrillen zur Folge hat.

A 2 Bisherige Erkenntnisse zum molekularen Mechanismus der GC-Aktivierung

A 2.1 Lokalisierung des Aktivierungsprozesses im Zellinneren

Der molekulare Mechanismus der Enzymaktivierung ist nach wie vor umstritten. Als sicher gilt, daß im Falle der Gefäßmuskelrelaxation die Wirkung durch die im Cytoplasma gelöste GC vermittelt wird (39). Präparationen der strukturgebundenen GC lassen sich durch die erwähnten muskelrelaxierend wirksamen Verbindungen nicht stimulieren. Für einen Angriff der organischen Nitrate und ähnlicher Verbindungen an der GC selbst sprechen auch Untersuchungen, die Gruetter et al. (26, 27) durchgeführt haben: In vitro läßt sich eine Stimulierung zellfreier GC-Präparationen mit elektrophilen, oxidierenden Agenzien wie Methylenblau und Kaliumferricyanid hemmen. Die durch NO-haltige Verbindungen am aufgespannten Koronarstreifen induzierte Relaxation wird jedoch nur durch Methylenblau aufgehoben. Kaliumferricyanid besitzt keine ausreichende Lipophilie, um durch Zellmembranen permeieren zu können und kann seine Hemmwirkung an der offensichtlich intrazellulär lokalisierten GC nicht entfalten. Bei der vorliegenden Arbeit wurden stets Präparationen der löslichen, cytoplasmatischen GC verwandt.

A 2.2. Einfluß von Cystein und anderen Thiolen auf die GC-Aktivierung

Bisherige Untersuchungen haben ergeben, daß organische Nitrate das Enzym nur in Gegenwart von Cystein ausgeprägt stimulieren können (37, 39). Auch funktionelle Studien zur Gefäßrelaxation, wie sie von Needleman und Johnson (69) durchgeführt wurden, ließen eine Wirksamkeit von organischen Nitraten nur in Gegenwart von Sulfhydrylgruppen im Gewebe erkennen. Verbindungen wie NPN, Natriumnitrit, Stickoxid (NO), Nitrosamine und die beiden Hauptmetabolite des Molsidomins SIN-1 und SIN-1A (71) sind aber in der Lage, das Enzym auch ohne Zusatz von Cystein zu stimulieren. Allerdings können verschiedene Thiole wie GSH, Dithiothreitol (DTT) oder Penicillamin die Enzymaktivierung noch zusätzlich verstärken (27). Im Falle des Natriumnitrits wird auch ein Verstärkereffekt auf die Enzymaktivierung durch die ebenfalls reduzierend wirksame Ascorbinsäure beschrieben (27). Dies und die schon erwähnte Hemmung durch Oxidantien wie Methylenblau zeigen, daß bei der Regulierung der GC-Aktivität offensichtlich Redoxprozesse eine entscheidende Rolle spielen.

A 2.3. Nitrosothiole und Nitroso-Hämkomplexe als mögliche Mediatoren der GC-Aktivierung durch organische Nitrate

Ignarro et al. führen die stimulierende Wirkung der organischen Nitrate auf die Bildung von S-Nitrosocystein zurück (39). Untersuchungen mit synthetisiertem, reinem S-Nitrosocystein und anderen S-Nitrosothiolen ergaben, daß es sich bei diesen Verbindungen ebenfalls um starke Stimulatoren der GC handelt. Auch die hämodynamischen Effekte der S-Nitrosothiole, wie z.B. der Abfall des arteriellen Blutdrucks, ähnelten denen der organischen Nitrate in hohem Maße.

Nach neueren Arbeiten von Craven und DeRubertis soll es sich bei den aktiven Zwischenstufen um Nitroso-Hämkomplexe handeln (13). Sie fanden, daß hämfreie Präparationen der GC durch S-Nitrosothiole nicht stimuliert werden können und daß unter den angegebenen Reaktionsbedingungen die Bildung eines stabilen NO-Hämkomplexes wahrscheinlicher ist als die eines S-Nitrosothiols.
Es scheint jedoch sicher, daß die organischen Nitrate abgebaut werden müssen, bevor sie wirksam werden können. In Gegenwart von Cystein oder auf enzymatischem Wege wird aus ihnen reduktiv Nitrit abgespalten, das über salpetrige Säure in NO als stimulierendes Agens umgewandelt wird.

B PROBLEMSTELLUNG

B 1 Frage nach der Abhängigkeit der GC-Aktivierung von der Struktur der organischen Nitrate

Es sollte geklärt werden, ob sich für die organischen Nitrate am isolierten Enzym strukturabhängige Wirkunterschiede ausmachen lassen. Zu diesem Zweck stand eine Reihe von Substanzen zur Verfügung, die sich in der Anzahl und der sterischen Anordnung der Nitratgruppen unterschied. Es sollte eine geeignete, ausreichend empfindliche Methode zur Erstellung reproduzierbarer Konzentrations-Wirkungskurven und zur Bestimmung der jeweiligen EC_{50} an der GC entwickelt werden, um so Aufschluß über die Struktur-Wirkungsbeziehungen bei den organischen Nitraten zu erhalten.

B 2 Frage nach einer Beziehung zwischen Nitratabbau (NO-Freisetzung) und GC-Aktivierung

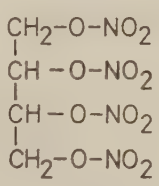
Als wirksames Agens bei der GC-Stimulierung gilt das Stickstoffmonoxid (NO), das beim enzymatischen Abbau oder in Gegenwart von Thiolen wie Cystein aus den organischen Nitraten freigesetzt wird. Die Untersuchung des Nitratabbaus unter Einfluß verschiedener Thiole sollte Aufschluß darüber geben, ob bei den untersuchten Verbindungen die freigesetzte NO-Menge jeweils mit der gemessenen GC-Aktivierung korreliert oder ob zwischen NO-Freisetzung einerseits und der GC-Aktivierung andererseits weitere bisher nicht bekannte biochemische Zwischenschritte eine essentielle Rolle spielen.
Da die Thiole unter dem Gesichtspunkt einer systematischen Abwandlung des Cysteinmoleküls ausgewählt wurden, sollte als zusätzlicher Aspekt die Bedeutung einzelner funktioneller Gruppen am Cysteingrundgerüst für den Nitratabbau und die GC-Aktivierung untersucht werden.

B 3 Präsentation der untersuchten Verbindungen

B 3.1 Aliphatische Verbindungen (Alditnitrate)

Von den offenkettigen Alditnitraten wurden die vollständig veresterten Verbindungen Erythrittetranitrat (ETN) und Nitroglycerin (GTN) eingesetzt (Abb. 1).

ETN
Erythrittetranitrat



GTN
Nitroglycerin

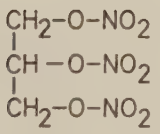


Abb. 1

Von den unvollständig veresterten, freie Hydroxylgruppen tragenden Verbindungen wurden die Metabolite des GTN untersucht. Dabei handelt es sich um die beiden Dinitrate 1,2-Glycerindinitrat (1,2-GDN) und 1,3-Glycerindinitrat (1,3-GDN) und das Mononitrat 1-Glycerinmononitrat (1-GMN) (Abb. 2).

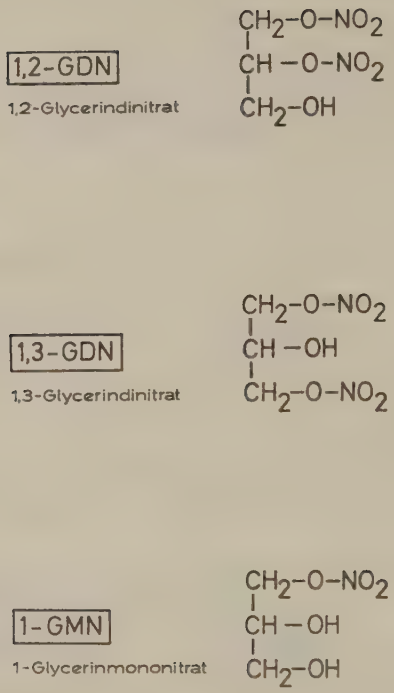


Abb. 2

B 3.2 Cyclische Verbindungen (1,4:3,6-Dianhydrohexitnitrate)

Die untersuchten cyclischen Verbindungen besitzen als Grundgerüst das 1,4:3.6-Dianhydrohexit. Werden die Hydroxylgruppen in 2- und 5-Stellung vollständig verestert, erhält man 3 Dinitrate, nämlich Isosorbiddinitrat (ISDN), Isomanniddinitrat (IMDN) und Isoididdinitrat (IIDN) (Abb. 3).

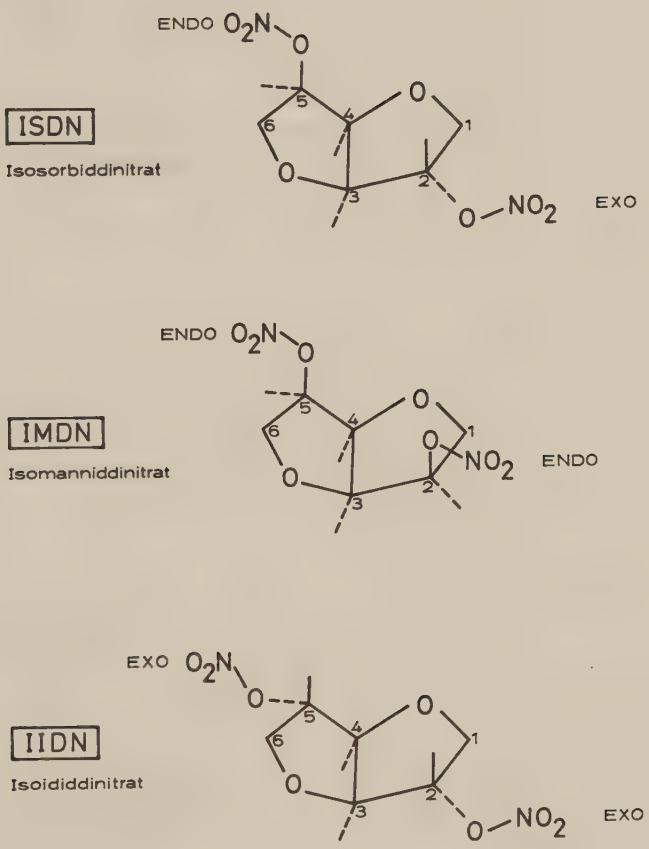

ENDO
O_2N
O
ISDN
Isosorbiddinitrat
5
4
6
O
1
O
3
2
O
NO_2
EXO
ENDO
O_2N
O
IMDN
Isomanniddinitrat
5
4
O
6
1
O
NO_2
ENDO
O
3
2
EXO
O_2N
O
IIDN
Isoididdinitrat
5
4
O
6
1
O
3
2
O
NO_2
EXO

Abb. 3

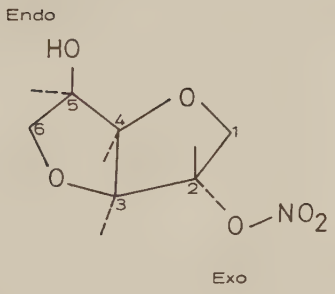
Die Formelbilder lassen die besondere Stereochemie der 1,4:3,6-Dianhydrohexitnitrate erkennen. Je nach der Stellung der Nitratgruppe zum Ringsystem unterscheidet man die äquatoriale exo-Position und die axiale endo-Position. Letztere kann aufgrund des abschirmenden Effektes des gewinkelten Grundgerüsts als sterisch gehindert bezeichnet werden. Außerdem sind elektronische Effekte zu berücksichtigen:
Der Ringsauerstoff an den C-Atomen 1 und 4 kann Reaktionen an der endo-Nitratgruppe am C-Atom 5 beeinflussen.
Zu den aus dieser Gruppe untersuchten Mononitraten (Abb. 4) gehören die beiden Metabolite des ISDN, das Isosorbid-5-Nitrat (IS-5-N) und das Isosorbid-2-Nitrat (IS-2-N). Ferner wurden die in 2-Stellung veresterten Mononitrate Isoidid-2-Nitrat (II-2-N) und Isomannid-2-Nitrat (IM-2-N) eingesetzt.

B 3.3 Derivate

Um den Einfluß weiterer sterischer Faktoren und einer Lipophilieerhöhung auf die GC-Aktivierung zu untersuchen, dienten folgende Derivate (Abb. 5):

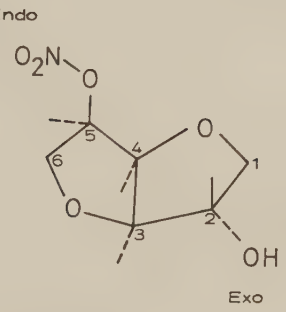
IS-2-N

Isosorbid-2-Nitrat



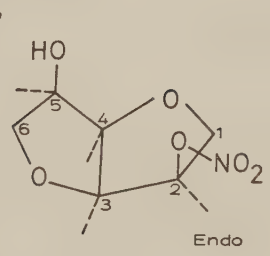
IS-5-N

Isosorbid-5-Nitrat



IM-2-N

Isomannid-2-Nitrat



II-2-N

Isoidid-2-Nitrat

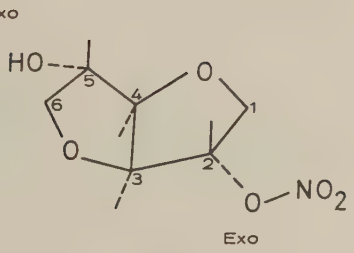
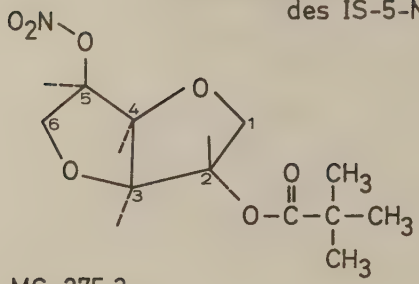


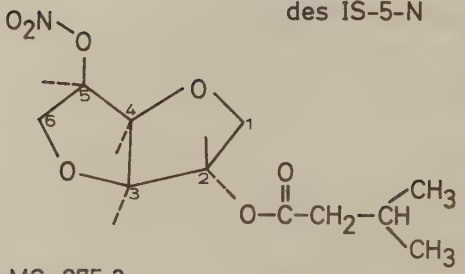
Abb. 4

Pivalinsäureester
des IS-5-N



MG 275,3

Isovaleriansäureester
des IS-5-N

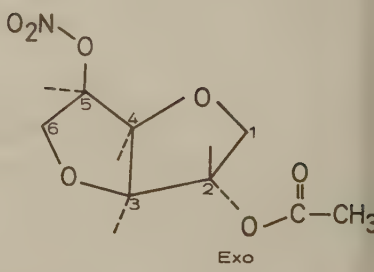


MG 275,3

IS-2-Ac-5-N

Isosorbid-2-Acetat-
5-Nitrat

Endo

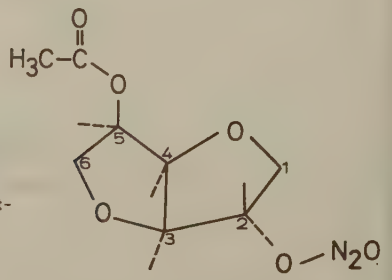


Exo

IS-5-Ac-2-N

Isosorbid-5-Acetat-
2-Nitrat

Endo



Exo

Abb. 5

C METHODEN (Experimenteller Teil)

C 1 Aufbau einer geeigneten Methode zur Erstellung reproduzierbarer Konzentrations-Wirkungskurven von organischen Nitraten an der GC

C 1.1 Präparation

C 1.1.1 Präparation der GC aus Rattenleber zur Stimulierung mit Natriumazid

Da die organischen Nitrate nur in geringer Menge zur Verfügung standen, wurde als Testsubstanz zur GC-Stimulierung zunächst Natriumazid (NaN_3) eingesetzt. Die Präparation der GC aus Rattenleber wurde modifiziert nach Kimura et al. (45) durchgeführt.

Weibliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von ca. 200 g wurden mit Diethylether betäubt und mit einem Schnitt durch die Kehle getötet. Anschließend wurde die Leber möglichst schnell herauspräpariert und in einer eisgekühlten 0,25 M Saccharoselösung aufbewahrt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte im Kühlraum bei +4°C. 2 g Lebergewebe (Feuchtgewicht) wurden abgewogen und in einer Petrischale mit einer Schere zerkleinert, bis das Gewebe eine breiige Konsistenz annahm. Anschließend wurde eine Homogenisierung nach Potter-Elvehjem in 18 ml 0,25 M Saccharoselösung durchgeführt, die 5 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,5) enthielt (Enzympuffer). Das auf diese Weise erhaltene Homogenat wurde bei 105.000 g 1 h lang zentrifugiert (Ultrazentrifuge, Beckman Instruments, München, Mod. L5-50, Festwinkelrotor 60 TI). Der klare Überstand (lösliche Enzymfraktion) wurde mit einer Eppendorff-Pipette (1 ml) portionsweise vorsichtig abpipettiert, um eine Vermischung mit der oben aufschwimmenden Lipidschicht zu vermeiden.

Anschließend wurde der Proteingehalt nach Lowry et al. (57) (s. C 1.2) bestimmt, mit Enzympuffer die gewünschte Konzentration eingestellt und die so erhaltene Lösung direkt im GC-Test eingesetzt (s. C 1.3).

C 1.1.2 Präparation der GC aus Rattenleber zur Stimulierung mit organischen Nitraten

Es wurden ebenfalls weibliche Wistar-Ratten eingesetzt, denen 24 h vor Versuchsbeginn das Futter entzogen wurde (61). Wasser wurde ad libitum gegeben. Dadurch sollte die Menge an Lipiden, die sich bei der Präparation nach C 1.1.1 als störend erwiesen hatte, verringert werden. Außerdem wurde den Ratten eine halbe Stunde vor Versuchsbeginn Natriumheparinat (2000 I.E.) subcutan injiziert, um ein besseres Ausbluten zu erreichen und die Bildung von Mikrothromben in der Leber zu verhindern. Dadurch sollte die Verunreinigung der Präparation mit roten Blutkörperchen bzw. Hämoglobin verringert werden, da letzteres die GC-Aktivierung durch NO-haltige Verbindungen hemmt (16, 26, 51, 67). Dieser Effekt beruht möglicherweise auf der inhibierenden Wirkung von Methämoglobin, das zumindest in Spuren stets gemeinsam mit Hämoglobin auftritt (26, 59). Der 0,25 M Saccharoselösung und dem Enzympuffer wurden wahlweise je 2 mM Dithiothreitol (DTT) oder 2 mM Mercaptoethanol (89) zugesetzt. Diese Thiole sollten bei der bekannten Empfindlichkeit der GC gegen oxidative Alterungsprozesse (9) eine Verminderung der Stimulierbarkeit verhindern. Ansonsten wurde wie bei der unter C 1.1.1 beschriebenen Präparation verfahren.

C 1.1.2.1 Wahl einer geeigneten Lagerung des Enzyms

Um die Bedingungen bei der Aufnahme reproduzierbarer Konzentrations-Wirkungskurven zu standardisieren, war es nötig, über längere Zeit mit ein und derselben GC-Präparation zu arbeiten. Um die Stimulierbarkeit einer frisch präparierten Enzymfraktion über längere Zeit zu erhalten, wurde nach ausgedehnten Voruntersuchungen wie folgt verfahren:

Die Enzymlösung wurde auf die gewünschte Proteinkonzentration verdünnt und in Portionen von 1 ml in verschließbaren Eppendorff-Reaktionsgefäßen eingefroren. Da bei den ersten Präparationen keine Möglichkeit bestand, das Enzym bei -80°C zu lagern, wurde eine Aufbewahrung bei -20°C (Tiefgefrierfach) versucht. Die Stimulierbarkeit war jedoch nach 24 h völlig verschwunden, während die Basalaktivität konstant erhalten blieb. Um den Einfluß des Luftsauerstoffs zu vermindern, wurde vor dem Einfrieren eine Begasung mit Argon durchgeführt, in Anlehnung an Ohlstein et al. (75), die eine Lagerung unter Stickstoffatmosphäre beschreiben. Hierbei wurde die bereits verdünnte Enzymlösung 10 min lang (1 l Argon/min) begast. Auch aus den Eppendorffgefäßen wurde die Luft verdrängt, indem sie je 5 s unter den Argonstrom gehalten wurden (2 l Argon/min). Dadurch konnte die Lagerfähigkeit nicht wesentlich verbessert werden. Erst der Zusatz der in C 1.1.2 beschriebenen Antioxidantien Dithiothreitol bzw. 2-Mercaptoethanol in Konzentrationen von 2 mM zum Enzympuffer und Kühlung auf -80°C ließen eine Lagerung von mehr als einem Jahr bei Erhalt der vollen Stimulierbarkeit zu. 2 mM Mercaptoethanol wurden später sämtlichen Lösungen und Puffern zugesetzt, die bei der Enzympräparation eingesetzt wurden.

Die tiefgefrorene Enzymlösung wurde vor dem GC-Test in einem Eisbad während ca 2 h aufgetaut. Dieses schonende Verfahren wurde gewählt, nachdem ein schnelles Auftauen bei +4°C innerhalb von 15 min zu unerwünschten, signifikanten Erhöhungen der Basalaktivität um 50% führte. Ein ähnlicher aktivitätssteigernder Effekt wurde beobachtet, wenn die Enzymlösung erst nach dem Auftauen auf den gewünschten Proteingehalt verdünnt wurde. Dieses Phänomen trat auch bei Untersuchungen mit tiefgefrorenen Präparationen der Adenylatcyclase auf, die von einer anderen Arbeitsgruppe ebenfalls im Institut für Pharmakologie/Düsseldorf durchgeführt wurden.

C 1.1.3 Präparation mit Reinigung der GC zur Erhöhung der Enzymsensibilität

Um die organischen Nitrate in ihrer Wirkung an der GC besser differenzieren zu können, mußte deren Sensibilität weiter erhöht werden. Dies wurde außer durch Optimierung des GC-Tests (s. D 1 - D 8) über zusätzliche Reinigungsschritte innerhalb der Enzympräparation erreicht, die im folgenden näher beschrieben werden.

C 1.1.3.1 Perfusion der Rattenleber in situ

Eine Perfusion der Rattenleber wurde modifiziert nach Ignarro et al. (34, 38) durchgeführt, um den größten Teil des Blutes und damit des störenden Hämoglobins aus dem Gewebe zu entfernen. Lehotay et al. (55) haben außerdem im Rattenleberperfusat einen Inhibitor der GC nachgewiesen, bei dem es sich um ein Peptid mit einem Molekulargewicht von 1000 handelt (56), dessen Gewebekonzentration durch eine ausreichend lange Perfusion ebenfalls vermindert werden sollte. Die ersten Versuche wurden an heparinisierten Ratten (s. C 1.1.2) vorgenommen, die mit 10 mg subcutan injiziertem Pentobarbital-Natrium betäubt wurden (60). Bei raschem Vorgehen läßt sich eine effizientere Perfusion problemloser auch am kurz zuvor getöteten Tier (s. C 1.1.1) durchführen. Da die üblicherweise auftretende Verengung der Gefäße zu diesem Zeitpunkt noch nicht so weit fortgeschritten war, konnte eine Kanülierung der Pfortader bequem durchgeführt werden. Die Operation wurde modifiziert nach Miller et al. (61) vorgenommen (Abb. 6).

LEBERPERFUSION — Lage der Ligaturen

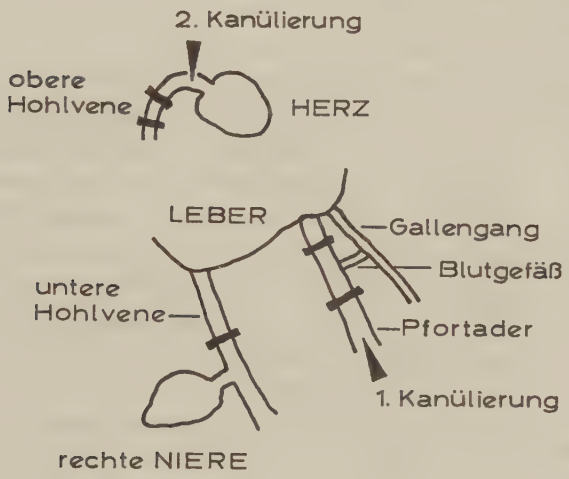


Abb. 6

Die Bauchhöhle der Ratte wurde geöffnet, die untere Hohlvene zwischen Leber und rechter Niere abgebunden und die Kanüle bei bereits laufender Perfusionspumpe in die ventral geöffnete Pfortader eingeführt (83). Als Kanüle diente eine schräg angeschnittene und angerauhte Braunüle (1,2 mm Durchmesser). Bei der Perfusion wurde eine Verder Schlauchpumpe (Typ VRX 88) verwandt, deren Druckschlauch zur Erzielung eines möglichst gleichmäßigen Flusses eine Länge von mindestens 1 m aufwies. Während der Kanülierung betrug die Flußstärke 5 ml/min, die während der weiteren Perfusion langsam und kontinuierlich auf 25 ml/min gesteigert wurde. Als Perfusionspuffer wurde eine eisgekühlte Lösung von 0,25 M Saccharose, 10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA und 2 mM Mercaptoethanol (pH 7,5) verwandt. Nach

erfolgreicher Kanülierung der Pfortader wurde der Thorax geöffnet und die obere Hohlvene angeschnitten und kanüliert, um für einen störungsfreien Abfluß der Perfusionslösung zu sorgen.

C 1.1.3.2 Präparation

Nach erfolgter Perfusion der Rattenleber in situ wurde die Enzympräparation in Anlehnung an Steurer und Schütz (89) durchgeführt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte unter ständiger Kühlung bei +4°C. Die Leber wurde herauspräpariert und 2 g Gewebe (Feuchtgewicht) abgewogen. Unter Zusatz von 1 ml Enzympuffer (0,25 M Saccharose, 10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, 2 mM Mercaptoethanol, pH 7,5) wurde das Gewebe in einer Petrischale mit einer Schere sorgfältig zerkleinert. Anschließend wurde der Gewebebrei in ein Zentrifugenröhrchen überführt, mit 20 ml Enzympuffer intensiv gewaschen und 10 min bei 1000 g zentrifugiert (Kühlzentrifuge vom Typ Sorvall RC 2-B, Rotor SS 34). Nach Dekantieren der Waschlösung wurde diese Prozedur ein weiteres Mal durchgeführt. Danach wurden 18 ml Enzympuffer zugesetzt (das Ansatzverhältnis Gewebe/Enzympuffer von 1:10 erwies sich bei allen Leberpräparationen als ausreichend konzentriert). Die Homogenisierung erfolgte nach Potter-Elvehjem (Glashomogenisator, Teflon-Pistill, 5 Stöße). Der Einsatz eines Messerhomogenisators vom Typ Ultra-Turrax (T 45, Fa. Janke + Kunkel) wurde nach den ersten Versuchen wieder aufgegeben, da durch Zerstörung mitgeschleppter Erythrocyten störendes Hämoglobin freigesetzt wurde. Dies machte sich in einer leichten Rosa-Verfärbung der Enzympräparation bemerkbar. Das Homogenat wurde 10 min bei 1000 g zentrifugiert, um eine schonende Abtrennung der gröberen Gewebefraktionen zu erzielen. Der milchig-trübe Überstand wurde danach bei 105.000 g 1 h lang zentrifugiert und als klare, seröse Enzymlösung, wie in C 1.1.1 beschrieben, abpipettiert und gesammelt.

C 1.1.3.3 Dialyse

Der Überstand der 105.000 g Zentrifugation wurde dialysiert, um den Einfluß inhibierender Ionen auf die GC, insbesondere von Calcium (28, 89) zu vermindern. Von einem Dialyseschlauch (Visking, Größe 3-20/32) wurde ein 20 cm langes Stück abgeschnitten und eine halbe Stunde in 1 mM EDTA Lösung gekocht, da die meisten im Handel erhältlichen Dialyseschläuche mit Schwermetallen, Proteasen und Nucleasen kontaminiert sind (12). Danach wurde diese Prozedur mit Aqua bidest. anstelle der EDTA-Lösung zweimal wiederholt. Mit einem Filterpapier wurde anhaftendes Wasser abgetupft und der Schlauch an einem Ende mit 2 Knoten verschlossen. Am offenen Ende wurde ein Plastikröhrchen eingeführt und der Dialyseschlauch mit einem Gummiband befestigt. Das Plastikröhrchen wurde in einen durchbohrten Gummistopfen gesteckt und das Ganze lose auf einen 2 l-Erlenmeyerkolben gesetzt, der den Dialysepuffer enthielt (0,25 M Saccharose, 10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 2 mM Mercaptoethanol, 100 mg/l Holzkohle, pH 7,5). Die zu dialysierende Lösung wurde vorsichtig mit einer Pipette durch das Plastikröhrchen in den Dialyseschlauch gegeben, wobei die Flüssigkeitsspiegel innerhalb und außerhalb des Schlauches schließlich die gleiche Höhe haben sollten. Die Enzymlösung wurde unter langsamem Rühren 4 h lang dialysiert, nach 2 h wurde der Dialysepuffer erneuert. Anschließend wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry et al. (57) durchgeführt und das Enzym, portioniert und auf die gewünschte Proteinkonzentration verdünnt, bei -80°C eingefroren.

C 1.1.4 Präparation der GC aus Schweinecarotiden

Der weitaus größte Teil der beschriebenen Untersuchungen wurde an GC aus Rattenleber durchgeführt, da diese Gewebeart täglich und in ausreichender Menge zur Verfügung stand. Um die Übertragbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse auf den Mechanismus der Gefäßrelaxation zu

sichern, wurde eine repräsentative Auswahl der organischen Nitrate in vergleichenden Untersuchungen an Enzympräparationen aus glatter Gefäßmuskulatur getestet. Bei der Präparation wurde wie folgt vorgegangen:
Die Carotisarterien von im Düsseldorfer Schlachthof frisch geschlachteten Schweinen wurden herauspräpariert und in eisgekühltem Puffer ins Labor transportiert. Bei dem Puffer handelte es sich um eine modifizierte Tyrode-Lösung (140 mM NaCl, 4,3 mM KCl, 1,2 mM K_2HPO_4, 1,2 mM $MgSO_4$, 0,5 mM $CaCl_2$, 5 mM Glucose, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5). Die weitere Aufarbeitung der Carotiden erfolgte bei +4°C. Die Arterien wurden von lose anhängendem Gewebe befreit und der Länge nach aufgeschnitten. Mit Hilfe zweier Pinzetten ließ sich die Intima-Media-Schicht, die die meisten glatten Muskelzellen enthält und für die weitere Präparation verwandt wurde, von der Adventitia abziehen. Eine Menge von 2 g Gefäßgewebe wurde unter Zusatz von 1 ml Enzympuffer in einer Petrischale mit einer Schere sorgfältig zerkleinert, in ein Polyethylenröhrchen überführt und mit 8 ml Enzympuffer versetzt. Das Ansatzverhältnis von 1:5 wurde wegen der im Vergleich zu Lebergewebe geringeren Proteinausbeute gewählt. Das Muskelgewebe wurde unter Kühlung im Eisbad mit Hilfe eines Messerhomogenisators vom Typ Ultra Turrax (T 45, Fa. Janke + Kunkel) während dreier 5 s-Impulse im Abstand von je 60s weiter zerkleinert. Eine Homogenisierung erfolgte anschließend in 2 Portionen zu 5 ml mit einem Homogenisator, der einen eingeschliffenen Glaskolben mit gitterartigen Einkerbungen enthielt. Das vereinigte Homogenat wurde 10 min bei 1000 g zentrifugiert (s. C 1.1.3.2), der resultierende Überstand nochmals 60 min lang bei 105.000 g. Der klare Überstand wurde, wie unter C 1.1.1 beschrieben, abpipettiert, gesammelt und dialysiert (s. C 1.1.3.3). Nach der Proteinbestimmung und der Verdünnung auf die gewünschte Konzentration wurde die Enzymlösung bei -80°C portioniert eingefroren.

C 1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der verschiedenen Präparationen wurde nach Lowry et al. (57) bestimmt; diese Methode erfordert wegen ihrer hohen Empfindlichkeit nur geringe Mengen Enzymlösung. Die Präparationen nach C 1.1.1 und C 1.1.2 wurden 1:50, die gereinigte GC-Präparation nach C 1.1.3 1:20 mit Wasser verdünnt, so daß die zu erwartende Endkonzentration im Bereich von 50 - 250 µg Protein/ml lag. Als Standard zur Aufnahme der Eichkurve diente Albumin aus Rinderserum (Serva, Heidelberg, lyophil. rein, 92% min, Cohn-Fract. V), das in einer Konzentration von 100 µg/ml eingesetzt wurde (Tab. 1). Vor jeder Bestimmung wurde aus den folgenden Stammlösungen eine Lösung A frisch hergestellt:

Lösung A:	2 % Na_2CO_3 in 0,1 N NaOH	40 ml
	1 % Natriumtartrat	0,8 ml
	0,5% $CuSO_4$	0,8 ml

Das Phenolreagenz nach Folin Ciocalteu wurde 1:3 verdünnt. Bei der Bestimmung wurde nach folgendem Probenschema vorgegangen:

Tab. 1: Probenschema zur Proteinbestimmung mit dem Phenolreagenz nach Folin-Ciocalteu.

Probenröhrchen	1	2	3	4	5	6	
Standard (0,1 mg/ml)	-	0,1	0,15	0,2	0,25	-	ml
H_2O	0,35	0,25	0,2	0,15	0,1	0,25	ml
Enzymlösung (1:20 bzw. 1:50 verd.)	-	-	-	-	-	0,1	ml
Lösung A	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	ml
	Schütteln der Proben und 5 minütige Inkubation bei 37°C						
Folin Ciocalteu (1:3 verd.)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	ml
	1 = Blindwert						
	2-5 = Eichwerte						
	6 = Probe						

Nach der Zugabe des Phenolreagenz wurde umgeschüttelt und 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 578 nm in einem auf 37°C temperierten Spektralphotometer der Fa. Beckman (Modell 25) gemessen. Vergleichsmessungen, bei denen den Standardproben 100 µl des entsprechend verdünnten Enzympuffers zugesetzt wurden, zeigten im Endergebnis keine Abweichung von den Proteinkonzentrationen, die sich bei rein wäßrigen Standardproben ergaben. Der störende Einfluß von Tris-HCl und Thiolen (12) trat also bei den beschriebenen Verdünnungen nicht auf. Abb. 7 zeigt eine typische Eichgerade.

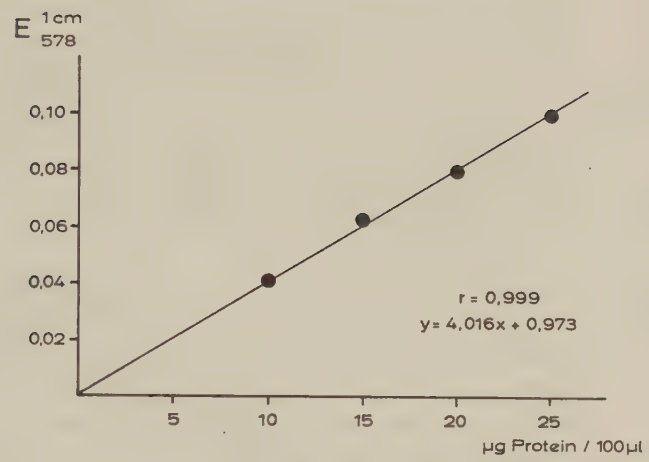


Abb. 7: Eichgerade zur Proteinbestimmung mit dem Phenolreagenz nach Folin-Ciocalteu.

Zur Kontrolle erfolgte die genaue Berechnung mit Hilfe eines linearen Regressionsprogramms auf einem Tischrechner der Fa. Hewlett-Packard (HP 97).

C 1.3 GC-Test

Die Aktivität der GC wurde über eine radioimmunologische Messung des aus GTP gebildeten cGMP bestimmt.
Das Inkubationsvolumen betrug 100 µl und enthielt 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), ein zweiwertiges Kation als Kofaktor, in der Regel 4 mM $MgCl_2$ (bei einigen Versuchen wurde $MnCl_2$ eingesetzt), 5 mM Cystein oder ein anderes Thiol und das organische Nitrat in der jeweils angegebenen Konzentration. Die Lösungen der Thiole und der organischen Nitrate wurden jeweils frisch bereitet, vor Versuchsbeginn im Eisbad gemischt und in Portionen

von 60 µl in eisgekühlte Polyethylenröhrchen (7,5 ml) gegeben. Als Substrat wurde GTP in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt, das, frisch bereitet, in Mengen von 20 µl dem Reaktionsansatz zugefügt wurde. Über die Anwendbarkeit von PDE-Hemmern und GTP-regenerierenden Systemen wurden Untersuchungen durchgeführt, die unter D 4 und D 7 beschrieben sind.

Die an der GC für das Substrat GTP gefundenen K_m-Werte liegen je nach Kofaktor und Aktivierungszustand zwischen 20 und 100 µM (22, 35, 92). Eine Umsetzungskinetik nullter Ordnung $v = V_{max}$ liegt vor, wenn [GTP] > 10 K_m, so daß bei einer GTP-Konzentration von 1 mM der Substratüberschuß genügend groß und die Umsetzungsrate proportional zur Inkubationszeit ist. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 20 µl Enzymlösung gestartet, die, wie unter C 1.1.2.1 beschrieben, aufgetaut wurde. Diese Menge betrug bei den Konzentrations-Wirkungskurven 30 µg Protein. Nach der Enzymzugabe wurden die Röhrchen sofort ins Wasserbad (37°C) gestellt und 15 min inkubiert. Während dieser Zeit war die Zunahme an cGMP sowohl im aktivierten wie im nicht aktivierten Zustand des Enzyms linear (47). Die Reaktion wurde mit 0,9 ml 35 mM EDTA-Lösung (pH 7,5) (36) abgestoppt und die Proben auf Eis gesetzt. Die Verwendung von Natriumacetatlösung (pH 4) zur Beendigung der Reaktion lieferte identische Ergebnisse (45). Proben, die entweder ohne Enzym oder ohne GTP inkubiert wurden, dienten als Reagenzienleerwerte und zeigten in beiden Fällen vernachlässigbare Mengen an gebildetem cGMP (über die Bildung von cGMP auf nichtenzymatischem Wege, z.B. durch GTP-regenerierende Systeme, s. D 7). Kurzzeitiges Erhitzen der Proben als zusätzliches Mittel zur Reaktionsterminierung (19, 24) (90°C, 5 min) erwies sich als unnötig und führte außerdem zu einem leichten Anstieg der Reagenzienwerte vermutlich infolge nichtenzymatischer cGMP-Bildung (46). Nach dem Abstoppen der Reaktion wurden die Proben, sofern nötig, auf einen cGMP-Gehalt

verdünnt, der eine radioimmunologische Messung im Bereich größter Genauigkeit zwischen 1 und 4 pMol cGMP/Teströhrchen ermöglichte. Bei den Verdünnungen, die im Bereich von 1:2 bis 1:25 lagen, wurde ebenfalls eine Lösung von 35 mM EDTA (pH 7,5) verwandt.
Nach den Vorversuchen zur methodischen Optimierung (s. D 1 bis D 8) wurde für die Aufnahme der Konzentrations-Wirkungskurven ein Inkubationsvolumen gewählt, das außer den zu testenden Nitraten ein Minimum an Fremdsubstanzen enthielt und sich wie folgt zusammensetzte:

50 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
4 mM	$MgCl_2$
5 mM	Cystein
1 mM	GTP
30 µg	Protein

C 1.4 Bestimmung von cGMP

C 1.4.1 Meßprinzip des Radioimmunoassays

Das im GC-Test gebildete cGMP wurde radioimmunologisch mit einem cGMP-Ria kit der Firma Amersham Buchler/Braunschweig bestimmt.
Dabei beruht das Meßprinzip auf einer Verdrängungsreaktion zwischen nicht markiertem (kaltem) cGMP aus dem GC-Test und einer konstanten Menge der gleichen tritiummarkierten Verbindung. Dieses Gleichgewicht stellt sich an einem Antikörper mit hoher Spezifität und Affinität für cGMP ein. Je mehr cGMP die im RIA-Test vermessenen GC-Proben enthalten, desto höher ist die Konzentration des aus seinen Bindungsstellen am Antikörper verdrängten, radioaktiven cGMP in der Lösung. Nach Isolierung des Antikörpers über eine Ammoniumsulfatfällung mit anschließender Zentrifugation ist die Restradioaktivität im Sediment ein reziprokes Maß für das von der GC gebildete cGMP und damit für die Enzymaktivität.

C 1.4.2 Aufarbeitung der Proben

Eisgekühlte Polystyrolröhrchen wurden mit 50 µl bzw. 0,4 pMol einer Lösung von (^{3}H)cGMP beschickt. Aus dem entsprechend verdünnten GC-Ansatz wurde eine aliquote Menge von 100 µl hinzugefügt. Nach Zugabe von 50 µl Antiserum wurde kräftig geschüttelt und der Ansatz im Eisbad bei +4°C Raumtemperatur 90 min inkubiert. Bei den ersten Versuchen stellte sich heraus, daß die Verdrängung des radioaktiven cGMP über die vom Hersteller des Antikörpers empfohlene Inkubationszeit von 90 min hinaus stattfand, d.h. die gemessenen Zerfallsraten in der Lösung nahmen langsam aber stetig zu und täuschten so eine geringere GC-Aktivität vor. Um die weitere Aufarbeitung zu beschleunigen, wurde die anfänglich benutzte Heraeus-Christ Zentrifuge (Typ Universal Junior JKS) mit einer Kapazität von 16 Röhrchen durch eine Kühlzentrifuge vom Typ Sigma 3K-2 ersetzt, die mit einer Kapazität von 48 Röhrchen und einer Maximalbeschleunigung von 4300 g deutlich überlegen war. Die Sedimentation war unter diesen Bedingungen nach 5-10 min beendet. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und die im Röhrchen verbliebenen Lösungsreste mit einem Wattestäbchen sorgfältig entfernt. Der Antikörper wurde in 1,1 ml H_2O aufgenommen und durch kräftiges Schütteln gelöst. Anschließend wurde 1 ml abpipettiert und in vorbereitete Szintillationsgefäße gegeben, die 7,5 ml Gelszintillator enthielten (Unisolve I, Zinsser Analytic GmbH., Frankfurt). Es wurde bis zur völligen Transparenz geschüttelt und die Lösung anschließend 2 h stehengelassen, um störende Luftblasen zu entfernen.

C 1.4.3 Messung der Radioaktivität durch Szintillationsspektrometrie

Bei dem verwandten Radionuklid handelt es sich um einen niederenergetischen Beta-Strahler, dessen geringe Strahlungsintensität durch die hochempfindliche Flüssigkeitsszintillationszählung am wirkungsvollsten er-

faßt wird. Die Radioaktivität des in C 1.4.2 beschriebenen Gemisches aus Szintillationscocktail und zu vermessender Lösung wurde in einem Flüssigkeitsszintillationszähler der Firma Beckman (Typ LS 9000) in Lichtimpulsen pro Minute (counts per minute = cpm) bestimmt. Da der Löscheffekt (Quench) der Proben und somit auch die Zählausbeute jeweils konstant war, erwies sich eine Berechnung der wahren Zerfallsrate in dpm (desintegrations per minute) als überflüssig. Der beschriebene Szintillationszähler besitzt 2 voneinander unabhängige Photokathoden mit Koinzidenz-Schaltung, was die Verfälschung durch die thermische Abspaltung von Photoelektronen auf ein erträgliches Mindestmaß reduziert. Die Proben wurden deshalb bei Raumtemperatur vermessen, zumal eine anfänglich durchgeführte, zusätzliche Kühlung infolge der hohen Umgebungstemperatur zur Bildung eines dünnen Films von Kondensationswasser auf den Szintillationsgefäßen und zu Ausfällen des Gerätes führte. Zwar erhöhte sich die Zählrate bei Raumtemperatur geringfügig, doch blieb dies dank der internen Eichgerade ohne Einfluß auf das Endergebnis. Nach Beendigung der Zählung von 10 min je Probe wurde das Ergebnis in "counts per minute" von einem angeschlossenen Schreiber (Teletype Modell 43) ausgedruckt. Dabei konnte durch Verlängerung der Zählzeit von 1 auf 10 min je Probe der sog. 2 Sigma-%-Fehler von ca. 10% auf 1-2% gesenkt werden. Dieser Wert berechnet sich wie folgt:

$$\pm 2\sigma \ (\%) = \pm \frac{200}{\sqrt{N}}$$

Dabei entspricht N der Gesamtzahl der in der vorgegebenen Zeit gezählten Lichtimpulse.

C 1.4.4 Rechnerische Auswertung

Zur Aufnahme einer Eichgeraden wurde ein Zerowert (C_o) bestimmt, der die gebundene Radioaktivität in Abwesenheit von unmarkiertem cGMP wiedergab. Statt 100 µl Probenlösung wurden 100 µl einer Lösung von 0,05 mM Tris-HCl (pH 7,5) und 4 mM EDTA in den Ansatz gegeben. Der Blindwert (Bl) zeigte die Zählrate bei völliger Verdrängung des radioaktiven cGMP vom Antikörper und wurde von allen erhaltenen Probewerten (C_x) einschließlich Zerowert subtrahiert. Zur Bestimmung des Blindwertes wurde dem Probenansatz ein 1000-facher Überschuß an nicht markiertem cGMP zugesetzt (= $0,2 \times 10^{-6}$ M).

Tab. 2 zeigt eine Reihe typischer Versuchsdaten für die Eichgerade.

Tab. 2: Typische Eichwerte zur radioimmunologischen Bestimmung von cGMP.

cpm	$\bar{x}$	$\bar{x}$-Bl	$\frac{C_o}{C_x}$	Standard cGMP pMol/Röhrchen
2021 1968	1995	1723(Co)	1	0
1127 1145	1136	864(Cx)	1,99	0,5
865 877	871	599(Cx)	2,88	1,0
617 635	626	354(Cx)	4,88	2,0
477 499	488	216(Cx)	7,98	4,0
381 383	382	110(Cx)	15,66	8,0
277 266	272(Bl)	-	-	-

Durch Bildung des Quotienten C_o/c_x läßt sich eine Eichgerade konstruieren (Abb. 8). Die genaue Berechnung der Probenwerte erfolgte mit Hilfe eines linearen Regressionsprogramms auf dem HP 97.

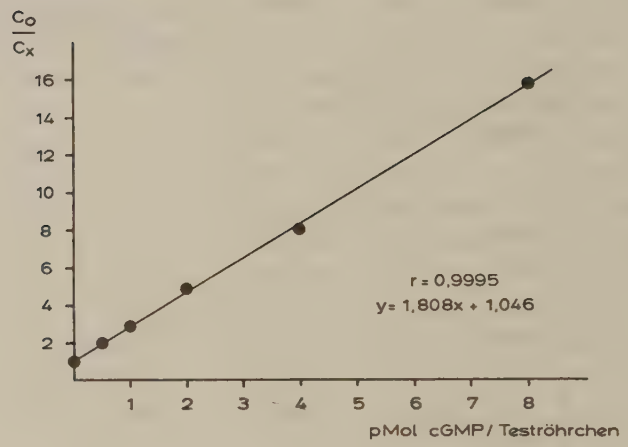


Abb. 8: Eichgerade zur radioimmunologischen Bestimmung von cGMP.

Die hiernach erhaltenen absoluten pMol Mengen cGMP wurden unter Berücksichtigung der verschiedenen Verdünnungsschritte in pMol cGMP/min/mg Protein umgerechnet.

C 1.4.5 Kreuzreaktivität mit GTP

Der einzige Bestandteil des GC-Tests der in der beschriebenen Konzentration für eine eventuelle Kreuzreaktivität mit dem cGMP-Antikörper in Frage kommt, ist das chemisch und in seinem antigenen Charakter dem cGMP ähnelnde Nukleotid GTP. Um die Affinität von GTP zu dem verwandten Antikörper zu untersuchen und damit seine Fähigkeit, cGMP aus den Bindungsstellen zu verdrängen, wurde die relative Bindung des radioaktiv mar-

kierten cGMP an das Antiserum in Gegenwart von steigenden Konzentrationen GTP gemessen (Abb. 9). Relative Bindung bezeichnet die gebundene Radioaktivität in Gegenwart von GTP (C_x), ausgedrückt in Prozent der maximal gebundenen Radioaktivität bei Fehlen von GTP (C_o):

$$\frac{Cx}{C_o} \cdot 100$$

Beim zweiten Versuch wurde der Einfluß steigender Konzentrationen von GTP auf das Verdrängungsgleichgewicht zwischen (^{3}H)cGMP und einer zusätzlichen konstanten Menge von 2 pMol nicht markiertem cGMP untersucht.

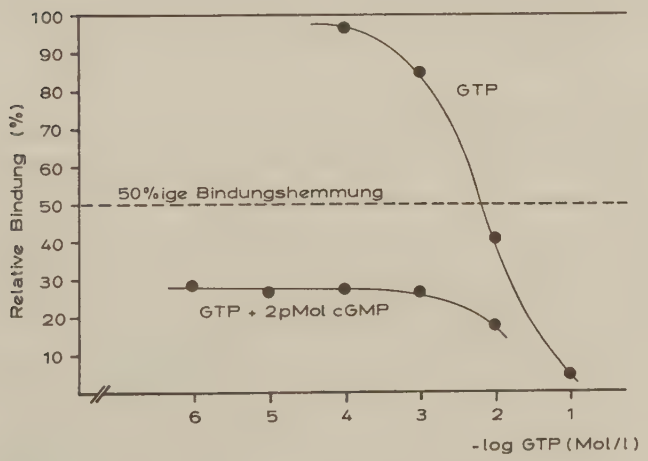


Abb. 9: Relative Bindung von cGMP an den Antikörper in Gegenwart von steigenden Konzentrationen GTP.

Bei einer Konzentration von 0,1 mM ist der Einfluß von GTP auf die Bindung des radioaktiv markierten cGMP ($0{,}2 \times 10^{-9}$ M, s. C 1.4.2) nicht mehr vorhanden. Die höchstmögliche GTP-Konzentration bei Vermessung unverdünnter, aliquoter Mengen aus dem GC-Test betrug 0,05 mM, wobei die meisten Proben außerdem, wie beschrieben, verdünnt wurden, d.h. die GTP-Konzentration im cGMP-Test lag um mindestens 1-2 Zehnerpotenzen unter dem kritischen Wert. Die zweite Kurve zeigt die Verfälschung eines typischen cGMP-Wertes (2 pMol) durch wachsende GTP-Konzentrationen. Bei diesem Verdrängungsgleichgewicht zwischen markiertem und nicht markiertem cGMP macht sich eine Störung durch GTP sogar erst bei einer Konzentration von 1 mM bemerkbar. Eine Veränderung der Werte durch eine Kreuzreaktivität von GTP mit dem Antikörper war also in jedem Fall ausgeschlossen.

C 1.4.6 pH-Abhängigkeit des RIA

Als Reagenz zur Terminierung des GC-Tests wurde während der ersten Versuche 50 mM Natriumacetatlösung (pH 4) benutzt. Zwar empfiehlt der Hersteller des Antiserums, die zu bestimmende Probelösung vorher auf einen pH-Wert von $7{,}5 \pm 0{,}5$ einzustellen, doch erwies sich dieser Schritt als überflüssig:

1.) Der Verlauf zweier bei pH 4 und pH 7,5 aufgenommenen Eichgeraden war identisch.
2.) Die wahlweise zum Abstoppen der Reaktion verwandte 35 mM EDTA-Lösung mit einem pH von 7,5 lieferte die gleichen Ergebnisse wie die Natriumacetatlösung mit einem pH von 4.

Hinweise darauf, daß Antikörper gegen cyclische Nukleotide in einem relativ weiten pH-Bereich vom Neutralen bis zum schwach Sauren (pH 4 - pH 7,5) gleich wirksam sind, finden sich in der Literatur (87, 88). Dabei spielen weniger die pK_a-Werte der basischen Funktionen im Guanin- bzw. Adeninmolekül eine Rolle, sondern die Tatsache, daß im sauren wie im neutralen Bereich die Zahl der verfügbaren Bindungsstellen am Antikörper gleich groß ist.

C 2 Messung des Nitratabbaus mittels HPLC

C 2.1 Aufarbeitung der Proben

Die organischen Nitrate entfalten ihre Wirkung auf die GC über den gemeinsamen Metaboliten NO. Um Aufschluß über die Abbauraten der im GC-Test eingesetzten Verbindungen zu erhalten, wurde die nach erfolgter Inkubation im Ansatz verbliebene Restmenge mittels HPLC bestimmt. Die Inkubationszeiten wurden auf 1 bzw. 3 h verlängert, da die nach 15 min abgebaute Menge für vergleichende Messungen der Abbaugeschwindigkeiten zu gering war. Die Konzentrationen der im GC-Test eingesetzten Substanzen wurden beibehalten, wobei die organischen Nitrate fast immer in einer Menge eingesetzt wurden, die der am Enzym gemessenen EC_{50} entsprach. Das Inkubationsvolumen wurde auf 200 µl erhöht, um genügend Probenmaterial für die HPLC-Bestimmungen zur Verfügung zu haben. Die zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion verwandte 35 mM EDTA-Lösung (pH 7,5), 0,9 ml, führte zu einer zu großen Verdünnung und störte die saubere Auftrennung der Nitrate und ihrer Metabolite im Chromatogramm. Statt dessen wurden die Proben nach Ablauf der Inkubationszeit auf Trockeneis gesetzt, wodurch der Nitratabbau wirkungsvoll gestoppt wurde. Proben, die ohne Thiole und Enzym inkubiert wurden, dienten als Standard. Die chromatographische Aufarbeitung erfolgte nach maximal 2 Tagen Lagerung bei -80°C. Eine zunächst bis zu 2 Wochen durchgeführte Aufbewahrung

der Proben wurde wieder aufgegeben, da unter diesen Bedingungen die Substanzen langsam weiter abgebaut wurden. Beispielsweise sank ein GTN-Kontrollwert, der in Gegenwart von Cystein und Enzym 2 Wochen bei -20°C aufbewahrt wurde, auf 10% der Ausgangskonzentration ab. Um eine Verfälschung durch wieder einsetzenden Abbau zu vermeiden, wurden die Proben einzeln unmittelbar vor dem Aufgeben auf die Trennsäule aufgetaut.

C 2.2 HPLC-Trennung und rechnerische Auswertung

Die Trennung des Substanzgemisches aus dem GC-Test erfolgte an einer HPLC-Station der Firma Waters, die aus folgenden Geräten bestand:

Automatischer Probennehmer (Waters Intelligent Sample Processor, WISP, Modell 710 B),

3 Pumpen, Modell 6000 A,

UV-Detektor, Modell 450,

Schreiber mit Integrator (Data Module), Modell M 730,

Steuergerät für automatischen Betrieb (System Controller) Modell M 721.

Die stationäre Phase bestand aus einer Kieselgelsäule (Waters 8C8, reversed phase). Als mobile Phase zur Trennung der Mononitrate eignete sich eine Lösung von 30%igem Methanol am besten, während für die lipophileren Dinitrate und das GTN 40%iges Methanol verwandt wurde. Die Verhältnisangaben beziehen sich auf Volumenprozent. Die Elutionsgemische wurden je 5 min im Ultraschallbad entgast und anschließend mit Helium durchperlt. Den physikalischen Eigenschaften der untersuchten organischen Nitrate entsprechend, wurden folgende Trennsysteme verwandt:

System 1 (Mononitrate)

Säule:	Kieselgel, 8C8, reversed phase 8 mm innerer Durchmesser 8 cm Länge 10 µm Korngröße
Mobile Phase:	Aqua bidest/Methanol (70:30)
Injektionsvolumen:	10 µl (ca. 1,9 µg Nitrat)
Flußgeschwindigkeit:	1 ml/min

System 2 (Dinitrate)

Säule:	Kieselgel, 8C8, reversed phase 8 mm innerer Durchmesser 8 cm Länge 10 µm Korngröße
Mobile Phase:	Aqua bidest/Methanol (60:40)
Injektionsvolumen:	50 µl (ca. 2,9 µg Nitrat)
Flußgeschwindigkeit:	2 ml/min

System 3 (GTN)

Säule:	Kieselgel, 8C8, reversed phase 8 mm innerer Durchmesser 8 cm Länge 10 µm Korngröße
Mobile Phase:	Aqua bidest/Methanol (60:40)
Injektionsvolumen:	50 µl (ca. 0,57 µg Nitrat)
Flußgeschwindigkeit:	3 ml/min

Die Detektion wurde bei 205 nm mit einem UV-Detektor vorgenommen. Der Papiervorschub betrug stets 1 cm/min. Mit Hilfe des Waters System Controller M 721 wurden die Chromatogramme quantifiziert und die Werte vom Schreiber in dimensionslosen Flächeneinheiten pro Peak ausgedruckt. Diese wurden in prozentuale Beziehung zum Flächenwert des Standards gesetzt und so der Nitratabbau berechnet. Abb. 10 zeigt ein Chromatogramm zur Messung des cysteinabhängigen Abbaus von ISDN und seinen Metaboliten.

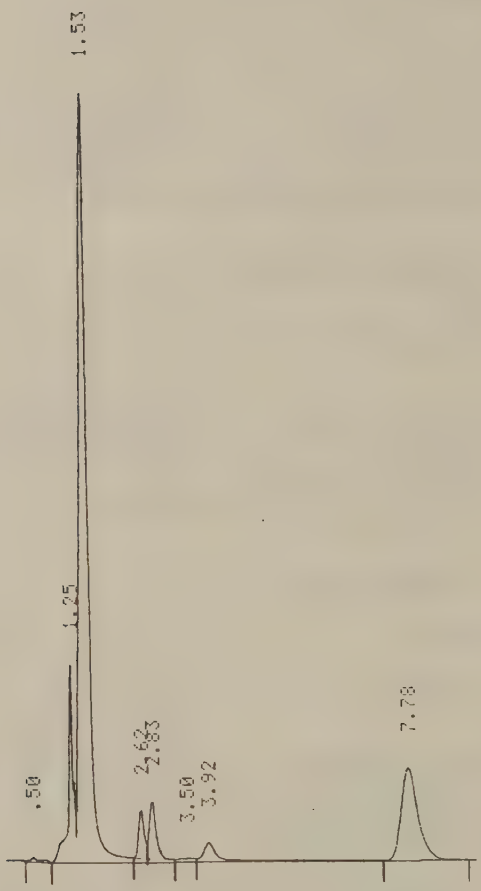


Abb. 10: HPLC-Trennung von 0,25 mM ISDN und seinen Metaboliten nach einer 12 h-Inkubation in Gegenwart von 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) und 5 mM Cystein

		Retentionszeit (min)
IS-2-N	=	2,62
IS-5-N	=	2,83
ISDN	=	7,78

C 3 Statistische Methoden

Die statistischen Berechnungen wurden auf dem Tischrechner HP 97 der Fa. Hewlett Packard ausgeführt. Dabei wurde die Signifikanz der Resultate bei Erfüllung der mathematischen Voraussetzungen des t-Tests nach Student errechnet. Die einzelnen Meßpunkte der Konzentrations-Wirkungskurven sind jeweils Mittelwerte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ (Standardabweichung des Mittelwertes) aus n = 3 Einzelexperimenten. Bei allen anderen Bestimmungen der GC-Aktivität handelt es sich um Mittelwerte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus n = 6 Einzelexperimenten, sofern keine weiteren Angaben gemacht werden. Die Prozentzahlen für den mit HPLC gemessenen Nitratabbau sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

C 4 Reagenzien

Aldrich-Chemie, Steinheim	4-Amino-2-mercaptopyrimidin 6-Mercaptopurin
Amersham/Buchler, Braunschweig	cGMP-RIA kit
Boehringer, Mannheim	cGMP (Mononatriumsalz) GTP (Dinatriumsalz)
Chemische Fabrik Tempelhof Preuß und Temmler, Berlin	Erythrittetranitrat
Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen	Heparin (Liquemin 2500®)
Merck, Darmstadt	EGTA EDTA (Dinatriumsalz) und alle hier nicht genannten Reagenzien
Pharma Schwarz, Monheim	Nitroglycerin (Perlinganit®), alle übrigen organischen Nitrate außer Erythrittetranitrat und den sterisch gehinderten Derivaten des IS-5-N (s. D 9.5)
Serva, Heidelberg	Albumin aus Rinderserum
Sigma, Taufkirchen	Alle übrigen Thiole Theophyllin
Zinsser Analytik, Frankfurt	Gelszintillator Unisolve I

Dr. Gioacchino Falsone Inst.f.org.Chemie Univ. Düsseldorf	IS-5-N-Pivalinsäureester IS-5-N-Isovaleriansäureester

D ERGEBNISSE (Theoretischer Teil)

D 1 GC-Aktivierung durch Natriumazid

Die ersten Versuche zur Aktivierung der isolierten GC wurden an frisch präparierten 105.000 g Überständen von Rattenleberhomogenat (s. C 1.1.1) vorgenommen. Die eingesetzte Endkonzentration betrug 1 mM NaN_3. Die GC-Aktivität wurde in Gegenwart von 4 mM $MnCl_2$ gemessen. Die Proteinkonzentration im Reaktionsansatz war 60 µg (Tab. 3).

Tab. 3: Einfluß von NaN_3 (1 mM) auf die GC-Aktivität.

Aktivator	GC-Aktivität in pMol cGMP/min/ mg Protein	Aktivierung
- NaN_3	28,8 ± 1,7	1
+ NaN_3	182,0 ± 5,6	6,3

Die Aktivierung der GC durch NaN_3 erforderte weder im Enzympuffer noch in der Inkubationslösung einen Zusatz von Thiolen (14). Bei einer Lagerungstemperatur von -80°C verlor sich die Aktivierbarkeit durch NaN_3 innerhalb von 3 Wochen vollständig.

D 2 GC-Aktivierung durch organische Nitrate in Gegenwart von Cystein

Die nach C 1.1.1 gewonnene GC-Präparation ließ sich durch GTN und andere organische Nitrate nur schwach aktivieren. Cystein bewirkte statt der erhofften Verstärkung der GC-Aktivierung durch organische Nitrate eine konzentrationsabhängige Hemmung. Die Messung erfolgte in Gegenwart von $MnCl_2$ und bei einer Proteinkonzentration von 40 µg (Tab. 4).

Tab. 4: Hemmwirkung von Cystein bei GC-Präparationen nach C 1.1.1 (ohne zusätzliche Antioxidantien). GTN-, NaN_3-Konzentration: 1 mM.

GC-Aktivität in pMol cGMP/min/mg Protein						
Basal	Basal 5 mM Cys	NaN3	GTN	GTN 0,1 mM Cys	GTN 1 mM Cys	GTN 5 mM Cys
24,0 ±1,1	- -	170,7 ±5,6	36,2 ±1,0	28,5 ±0,9	18,7 ±0,8	- -

Eine stimulierende Wirkung der NO-haltigen Verbindungen konnte erst festgestellt werden, nachdem die Enzympräparation, wie unter C 1.1.2 beschrieben, modifiziert wurde. Wichtigste Voraussetzung für die Wirksamkeit der organischen Nitrate war der Zusatz von 2 mM DTT oder Mercaptoethanol zum Enzympuffer, wodurch außerdem der inhibierende Einfluß von Cystein wieder aufgehoben wurde. Die Aktivierbarkeit durch NaN_3 blieb davon unbeeinflußt. Die Messung erfolgte in Gegenwart des Kofaktors Mg^{2+}, dem physiologisch im Vergleich zu Mn^{2+} die größere Bedeutung zukommt. Die Proteinkonzentration betrug 60 µg (Tab. 5).

Tab. 5: Stimulation der GC durch Nitroprussidnatrium (NPN) und Nitroglycerin (GTN)/Cystein (Präparation der GC nach C 1.1.2 unter Zusatz von Mercaptoethanol).

GC-Aktivität in pMol cGMP/min/mg Protein				
Basal	1 mM NaN3	1 mM NPN	1 mM GTN	1 mM GTN 5 mM Cys
6,3 ±0,5	38,3 ±1,3	120,1 ±6,1	14,2 ±0,7	853 ±13,4

Wie Tab. 5 zeigt, hat NPN auch ohne Zusatz von Cystein eine starke GC-stimulierende Wirkung, da es in wäßriger Lösung spontan NO freisetzt (37).

Eine erste orientierende Untersuchung der organischen Nitrate auf ihre unterschiedliche GC-Wirksamkeit ergab bereits eine reproduzierbare Reihenfolge, die in Tab. 6 dargestellt ist. Mit Abstand am stärksten ist die Stimulation bei GTN, der einzigen Verbindung mit drei Nitratfunktionen, dann folgt die Gruppe der Dinitrate, während die Mononitrate die geringste Aktivierung hervorrufen. Die Wirkunterschiede bei den 4 cyclischen Mononitraten II-2-N, IS-2-N, IM-2-N und IS-5-N weisen bereits auf die Bedeutung der sterischen Parameter hin.

Tab. 6: Abnehmende Stimulationsstärke an der GC bei 11 organischen Nitraten in Gegenwart von 5 mM Cystein (Präparation der GC nach C 1.1.2 unter Zusatz von Mercaptoethanol).

Organ. Nitrat	Konz. (mM)	GC-Aktivität in pMol cGMP/min/ mg Protein	Stimulationshöhe= Nitrataktivität / Basalaktivität
GTN	1	853 ± 13	150
IIDN	1	365 ± 20	64
ISDN	1	355 ± 11	62
IMDN	1	313 ± 15	55
IIDN	0,5	251 ± 9,4	44
ISDN	0,5	158 ± 7,6	28
IMDN	0,5	257 ± 10	45
1,2-GDN	1	290 ± 12	51
1,3-GDN	1	240 ± 10	42
II-2-N	1	148 ± 5,8	26
IS-2-N	1	132 ± 6,1	23
IM-2-N	1	116 ± 4,0	20
IS-5-N	1	52,2 ± 3,1	9
1-GMN	1	16,8 ± 1,2	3
Basal-aktivität	-	5,7 ± 0,2	1

D 3 GC-Aktivierung durch organische Nitrate in Abwesenheit von Cystein

Um die organischen Nitrate in ihrer Wirkstärke weiter differenzieren zu können, mußte die Sensibilität der GC erhöht werden. Aus diesem Grunde wurde eine Präparation des Enzyms mit den unter C 1.1.3 beschriebenen Reinigungsschritten durchgeführt. Dies führte einerseits zu einer Erhöhung der Nitrataktivierung in Gegenwart von Cystein, was insbesondere beim GTN und den Dinitraten die Aufnahme von Konzentrations-Wirkungskurven im mikromolaren Bereich ermöglichte. Der zweite wichtige Effekt der Enzymreinigung bestand darin, daß eine, wenn auch geringe Nitrataktivierung in Abwesenheit von Cystein beobachtet werden konnte.
Katsuki et al. (44) untersuchten 1977 die 100.000 g Überstände von verschiedenen Geweben auf ihre Stimulierbarkeit durch NO-haltige Verbindungen. Dabei machte die Arbeitsgruppe die Feststellung, daß Nitroglycerin ohne Zusatz von Thiolen die Aktivität der löslichen GC aus Rattenleber um 100-200% zu steigern vermag, unabhängig davon, ob Mn^{2+} oder Mg^{2+} als Kofaktor verwandt wurde.

Tab. 7 zeigt die Ergebnisse, die mit der nach C 1.1.3 gereinigten GC erzielt wurden. Die Enzymaktivität wurde in Gegenwart von 4 mM $MgCl_2$ gemessen. Der Einsatz von PDE-Hemmstoffen zur Verhinderung eines enzymatischen cGMP-Abbaus (vgl. Ausführungen unter D 4) erwies sich bei der gewählten Proteinkonzentration von 30 µg im Probenansatz als überflüssig. Der Effekt einer von GTN über die Dinitrate zu den Mononitraten abnehmenden GC-Aktivierung tritt auch bei Abwesenheit von Cystein wieder auf. Die um den Faktor 4 erhöhte Basalaktivität läßt einen Vergleich der Tabellen 6 und 7 nur über den dimensionslosen Quotienten aus Nitrataktivität und Basalaktivität sinnvoll erscheinen. Dabei erkennt man, daß das jeweilige Ausmaß der Aktivierung in

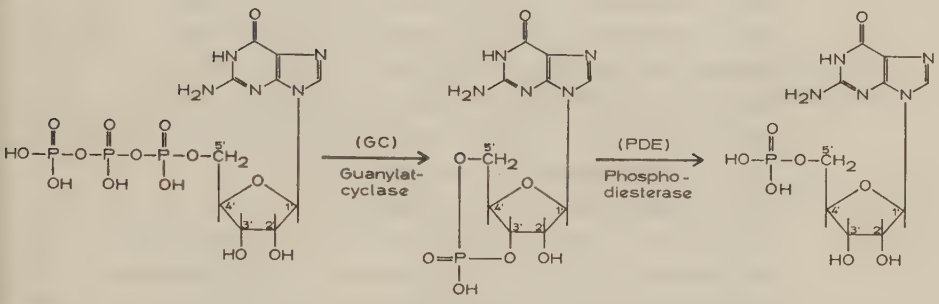
Abwesenheit von Cystein wesentlich unter dem liegt, das in Gegenwart von 5 mM Cystein gemessen wurden.

Tab. 7: GC-Aktivierung durch 11 organische Nitrate in Abwesenheit von Cystein. Bei den Aktivitäten handelt es sich um Mittelwerte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils n=9 Einzelexperimenten.

Organ. Nitrat	Konz. (mM)	GC-Aktivität in pMol cGMP/min/ mg Protein	Stimulationshöhe= Nitrataktivität / Basalaktivität
GTN	1	120,0 ± 10,0	5,29
IIDN	1	82,4 ± 7,9	3,63
ISDN	1	72,2 ± 3,1	3,18
IMDN	1	62,9 ± 0,9	2,77
1,2-GDN	1	56,4 ± 4,4	2,48
II-2-N	1	40,2 ± 0,7	1,77
1,3-GDN	1	40,0 ± 2,4	1,76
IS-2-N	1	37,6 ± 1,5	1,66
IM-2-N	1	27,3 ± 0,6	1,20
1-GMN	1	25,8 ± 2,2	1,14
IS-5-N	1	21,3 ± 0,9	0,94
Basal-aktivität	-	22,7 ± 1,0	1,00

D 4 Einfluß von PDE-Hemmern auf die GC-Aktivität

Bei den nach C 1.1.1 und C 1.1.2 präparierten GC-Fraktionen wurden verschiedene PDE-Hemmstoffe eingesetzt, da wegen der nur unvollständigen Reinigung ein Abbau des gebildeten cGMP durch die Phosphodiesterase nach dem unten aufgeführten Schema (Abb. 12) vermutet wurde.



Guanosin-5'-triphosphat (GTP)

Guanosin-3':5'-monophosphat (cGMP)

Guanosin-5'-monophosphat (GMP)

Abb. 12: Bildung von cGMP aus GTP und Abbau zu GMP durch die Phosphodiesterase.

Abbildung 11 zeigt, daß bei Proteinkonzentrationen von 60 µg und darunter die PDE-Aktivität im GC-Test auf einen Wert herabsinkt, der die Messung der GC-Stimulation ohne Zusatz eines PDE-Hemmers ermöglicht. In der Literatur wird außerdem eine störende direkte Inhibierung der GC-Aktivierung durch PDE-Hemmer beschrieben. Diese Effekte können bereits bei den im GC-Test üblichen Konzentrationen von 10 mM Theophyllin (84) bzw. 0,3 mM IBMX (37) auftreten. Eine zweite Möglichkeit, den abgebauten Anteil an gebildetem cGMP zu vermindern, besteht im Zusatz eines Überschusses an nicht markiertem cGMP zum Inkubationsvolumen, allerdings nur, wenn nicht mit RIA sondern mit markiertem Substrat (^{32}P-GTP) gearbeitet wird. Bei der Erstellung der Konzentrations-Wirkungskurven wurde die nach C 1.1.3 gereinigte Enzymfraktion in einer Konzentration von 30 µg Protein pro Probenansatz eingesetzt. Diese Bedingungen ließen eine Inkubation in Abwesenheit von PDE-Hemmern zu. Aus Gründen der Übersichtlichkeit und Reproduzierbarkeit der Stimulationseffekte wurde generell angestrebt, die Bestandteile des GC-Tests neben den organischen Nitraten, Puffer und GTP auf ein Minimum zu reduzieren.

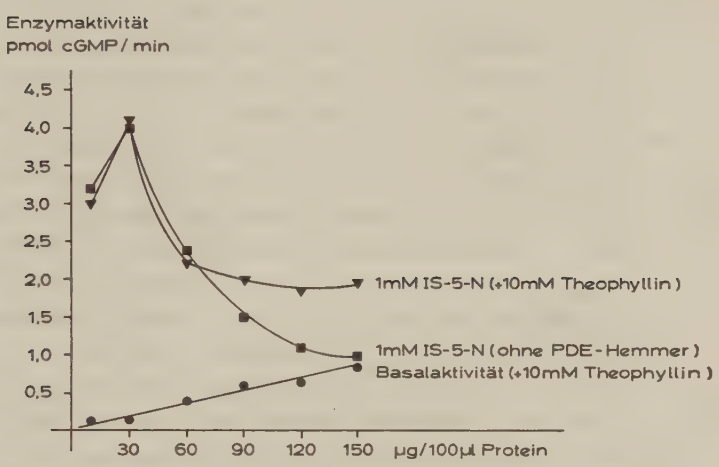


Abb. 11: Einfluß der Proteinkonzentration und des PDE-Hemmers Theophyllin auf die GC-Aktivität.

D 5 Einfluß der Proteinkonzentration auf die GC-Aktivität

Abb. 11 zeigt, daß die gebildete Menge cGMP im Falle der Basalaktivität, also in Abwesenheit einer Nitratverbindung, proportional zur Proteinkonzentration zunimmt. Im Gegensatz dazu steht die GC-Aktivität bei der Stimulierung mit IS-5-N in einem umgekehrt proportionalen Verhältnis zur eingesetzten Proteinkonzentration, d.h. die absolut gebildete Menge cGMP wird größer, je weniger Enzym der Probenansatz enthält. Die geringere Proteinkonzentration könnte eine freiere Entfaltung des GC-Proteins in der Inkubationslösung bedingen, wodurch die Verfügbarkeit katalytisch wirksamer Zentren ansteigt und das Protein eine für die Stimulation günstigere Konformation einnehmen kann. Außerdem führt die Verringerung der Proteinkonzentration zu einer relativen Erhöhung der IS-5-N-Konzentration, so daß pro Enzymeinheit mehr reaktionsfähige Nitratmoleküle zur Verfügung stehen. Ferner ist denkbar, daß der Einfluß inhibierender Faktoren, wie z.B. von Calciumionen (s. D 12), durch eine größere Verdünnung des Enzyms vermindert wird. Um bei der Erstellung der Konzentrations-Wirkungskurven die größtmögliche Empfindlichkeit der GC auszunutzen, wurden der Inkubationslösung stets 30 µg Protein zugesetzt.

D 6 Einfluß des Kofaktors (Mn^{2+}/Mg^{2+}) auf die GC-Aktivität

Unabhängig davon, aus welchem Gewebe die Isolation erfolgt, benötigt die GC ein zweiwertiges Kation als Kofaktor, d.h. der Metall-GTP-Komplex stellt das eigentliche Substrat dar.
Von den beiden am häufigsten eingesetzten Kationen Mg^{2+} und Mn^{2+} erwies sich das physiologisch relevantere Magnesium als günstiger, um die GC-Stimulierung durch organische Nitrate zu messen.

Tab. 8: Einfluß der Kofaktoren Mn^{2+} und Mg^{2+} auf die GC-Aktivität.

GC-Aktivität in pMol cGMP/min/mg Protein			
	Basal	1 mM IIDN 5 mM Cys	Aktivierung
4 mM Mn^{2+}	30,7 ± 1,4	42,5 ± 3,0	1,4
4 mM Mg^{2+}	6,3 ± 0,1	290,3 ± 12,1	46,0

Die Basalaktivität im Vergleich zu Mn^{2+} war in Gegenwart von 4 mM Mg^{2+} etwa um das Fünffache gesteigert (Tab. 8). Umgekehrt lagen die Verhältnisse bei der Stimulation mit einem organischen Nitrat in Gegenwart von 5 mM Cystein. Die mit 4 mM Mn^{2+} gemessene GC-Aktivität betrug nur 15% bezogen auf die Aktivität in Gegenwart von 4 mM Mg^{2+}. Ähnliche Ergebnisse erzielten Gruetter et al. mit Nitroprussidnatrium (28). Für die Erstellung von Konzentrations-Wirkungskurven der organischen Nitrate im mikromolaren Bereich kam also nur Mg^{2+} in Frage.

D 7 Einfluß des GTP-regenerierenden Systems auf die GC-Aktivität und die nichtenzymatische cGMP-Bildung

Der Einsatz eines GTP-regenerierenden Systems, das aus Creatinphosphat und Creatinkinase besteht, soll den vorzeitigen Abbau des Substrates durch Phosphatasen, wie sie in Homogenaten und Zellfraktionen vorkommen, verhindern. Bei den ersten Versuchen wurde eine Kombination aus 15 mM Creatinphosphat und 20 µg Creatinkinase verwandt, wodurch die Reagenzienleerwerte, die bis dahin vernachlässigbar waren, signifikant anstiegen. Dies kann auf eine nichtenzymatische Bildung von cGMP aus GTP unter dem Einfluß von Creatinphosphat zurückgeführt werden, wie sie von Kimura und Murad (46) nachgewiesen wurde. Die spontane Bildung von cGMP wird außerdem begünstigt durch pH-Verschiebungen in den alkalischen Bereich, durch steigende Konzentrationen an Mn^{2+} und durch das Erhitzen auf 90°-100°C, das von einigen Autoren als geeignete Methode zum Abstoppen und Denaturieren der GC beschrieben wird (19). Glass et al. (24) stellten eine Veränderung der kinetischen Eigenschaften der GC durch Creatinphosphat fest, das in niedrigen Konzentrationen eine direkte, GC-inhibierende Wirkung besitzen soll.

Aus diesen Gründen wurde bei der Messung der Konzentrations-Wirkungskurven auf ein GTP-regenerierendes System verzichtet, was wiederum dem Wunsch entgegenkam, den Anteil an Fremdsubstanzen im GC-Test möglichst gering zu halten. Das Fehlen eines GTP-regenerierenden Systems wirkte sich weder auf die Basalaktivität noch auf die Stimulationsstärke der organischen Nitrate aus.

D 8 Einfluß von Lösungsmitteln auf die GC-Aktivität

Das lipophile ETN lag in absolutem Ethanol gelöst vor. Die Endkonzentration des Ethanols im GC-Test betrug maximal 0,15 %. Vergleichende Untersuchungen mit GTN und variierenden Ethanolkonzentrationen ergaben, daß erst ab 0,5% eine Hemmung der GC-Aktivierung durch organische Nitrate auftritt. Die instabilen Metabolite des GTN (1,2-GDN, 1,3-GDN, 1-GMN) lagen ebenfalls als absolut ethanolische Lösung vor. Außerdem waren sie nicht rein darstellbar, sondern enthielten stets Verunreinigungen an GTN bzw. der anderen Metabolite (die übrigen organischen Nitrate waren GC- bzw. HPLC-rein). Dieser Umstand und die Tatsache, daß für die Aktivierung der GC höhere Konzentrationen als im Falle des ETN nötig waren, wodurch Ethanolkonzentrationen von 1% und mehr im GC-Test erreicht wurden, machte die Erstellung von reproduzierbaren Konzentrations-Wirkungskurven unmöglich.

Ferner wurde bei den lipophilen Pivalinsäure- und Isovaleriansäurederivaten des IS-5-N DMSO als Lösungsmittel eingesetzt. Die Endkonzentration im GC-Test lag bei 3%; in diesem Bereich findet bereits eine Verminderung der Basalaktivität und der durch Nitrate erhöhten Aktivität statt. Bei diesen Verbindungen wurden die Konzentrations-Wirkungskurven in rein wäßrigem Milieu nur bis zur EC_{50} aufgenommen, um ungestörte Vergleichsmöglichkeiten mit den nicht derivatisierten Nitraten zu haben. Glycerin und Triethylenglykol eigneten sich nicht als Lösungsmittel, weil ihre Dickflüssigkeit ein exaktes Pipettieren in die Reaktionsansätze verhinderte.

Als GTN-Stammlösung wurde im Handel erhältliche blutisotonische Injektionslösung verwandt.

D 9 Konzentrations-Wirkungskurven der organischen Nitrate an der GC aus Rattenleber

Die im folgenden gezeigten Konzentrations-Wirkungskurven wurden an GC-Fraktionen erstellt, die, wie unter C 1.1.3 beschrieben, präpariert und gereinigt wurden. Der Einfluß der zusätzlichen Reinigungsschritte auf die Aktivierbarkeit der GC im Vergleich zu ungereinigten Präparationen nach C 1.1.2 ist beachtlich (Tab. 9). IS-5-N wurde in beiden Fällen bei seiner halbmaximalen Wirkkonzentration eingesetzt:

Tab. 9: Steigerung der GC-Empfindlichkeit durch zusätzliche Reinigungsschritte (u.a. Dialyse) bei der Präparation.

GC-Aktivität in pMol cGMP/min/mg Protein		
	Enzympräparation nach C 1.1.2	Enzympräparation nach C 1.1.3
1 mM IS-5-N 5 mM Cystein	$52{,}2 \pm 3{,}1$	274 ± 23

Die Stimulierbarkeit der GC ist um 500% gesteigert.

Die einzelnen Meßpunkte der Konzentration-Wirkungskurven sind jeweils Mittelwerte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus n = 3 Einzelexperimenten, die mit derselben Enzymfraktion durchgeführt wurden. Bei Wiederholung der Messungen an zwei weiteren Enzympräparationen verliefen die Kurven übereinstimmend und lieferten die gleichen EC_{50}-Werte. Dies wird auf den hohen Standardisierungsgrad von Präparation und GC-Test zurückgeführt, wobei insbesondere die konstant bei 30 µg gehaltene Proteinkonzentration eine wichtige Rolle spielt. Die maximale Stimulierbarkeit war für alle geprüften organischen Nitrate gleich. Alle Konzentrations-Wirkungskurven wurden in

Gegenwart von 5 mM Cystein bestimmt. Die Begriffe Konzentrations-Wirkungskurve und EC_{50} wurden gewählt, weil es sich bei den eingesetzten Nitratmengen nicht um oral verabreichte Dosen mit zu berücksichtigender Bioverfügbarkeit handelte (= Dosis-Wirkungskurve, ED_{50}), sondern um unmittelbar am Zielenzym pharmakodynamisch wirksame Konzentrationen.

Bei der Auswertung wurde die Konzentration logarithmisch auf der Abszisse und die Wirkung (GC-Aktivität in pMol cGMP/min/mg Protein) linear auf der Ordinate dargestellt. Es ergab sich in jedem Fall ein typischer sigmoider Kurvenverlauf. Die Berechnung der EC_{50}-Werte erfolgte mit Hilfe eines mathematischen Iterationsverfahrens. Dabei wurde die sigmoide Konzentrations-Wirkungskurve im Wahrscheinlichkeitsnetz in eine Gerade transformiert und die Geradenparameter (Ordinatenschnittpunkt und Steigung) sowie der maximale Effekt für die Normierung auf 100% approximiert.

D 9.1 ETN - GTN - ISDN - IS-5-N

Einfluß der Nitratgruppenanzahl

Abb. 13 zeigt den Einfluß der Anzahl der Nitratgruppen pro Molekül auf die GC-Aktivierung. Dazu wurden 4 organische Nitrate untersucht, die auch therapeutisch eingesetzt werden. Die Wirksamkeit der Substanzen nimmt mit der Zahl der pharmakophoren, NO-liefernden Gruppen zu, die Konzentrations-Wirkungskurve an der GC erfährt eine gleichmäßige Linksverschiebung, ausgehend vom Mononitrat, über das Di- und Trinitrat bis zum Tetranitrat, das bereits im nanomolaren Bereich die Basalaktivität erhöht. Dabei wird die EC_{50} mit jeder weiteren Nitratgruppe jeweils um den Faktor 4 vermindert (Tab. 11).

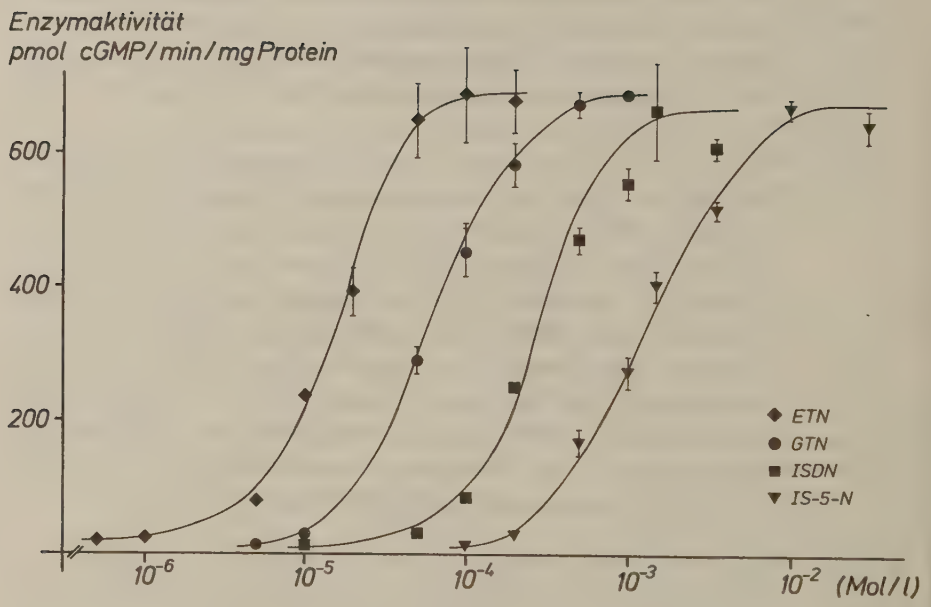


Abb. 13: Konzentrations-Wirkungskurven von 4 organischen Nitraten mit variierender Nitratgruppenzahl (n = 1-4).

Tab. 10 gibt die GC-Aktivitäten für die getesteten Nitratkonzentrationen an.

Tab. 10: Konzentrationsabhängige Aktivierung der GC durch ein Mononitrat (IS-5-N), Dinitrat (ISDN), Trinitrat (GTN) und Tetranitrat (ETN)

Basalaktivität: 16,4 ± 0,67 pMol cGMP/min/mg Protein							
ETN		GTN		ISDN		IS-5-N	
Konz. (mM)	pMol cGMP/ min/mg Prot.	Konz. (mM)	pMol cGMP/ min/mg Prot.	Konz. (mM)	pMol cGMP/ min/mg Prot.	Konz. (mM)	pMol cGMP/ min/mg Prot.
0,0005	19,6 ± 0,44	0,005	15,2 ± 0,35	0,01	16,2 ± 0,81	0,1	14,3 ± 0,2
0,001	23,6 ± 0,67	0,01	30,4 ± 1,7	0,05	33,7 ± 2,0	0,2	30,9 ± 0,6
0,005	81,3 ± 6,4	0,05	291 ±20	0,1	87,6 ± 8,8	0,5	168 ±17
0,01	238 ± 6,4	0,1	449 ±36	0,2	251 ± 9,6	1	274 ±23
0,02	393 ±36	0,2	579 ±32	0,5	469 ±19	1,5	399 ±22
0,05	647 ±58	0,5	671 ±19	1	554 ±23	3,5	514 ± 7,0
0,1	686 ±72	1	684 ± 8,7	1,5	662 ±74	10	663 ±13
0,2	675 ±48			3,5	605 ±14	30	637 ±24

Tab. 11: EC_{50} bei der GC-Aktivierung durch ein Tetranitrat (ETN), Trinitrat (GTN), Dinitrat (ISDN) und Mononitrat (IS-5-N)

Organ. Nitrat	n = Anzahl der Nitratgruppen pro Molekül	EC_{50} (mM)
ETN	4	0,0145
GTN	3	0,060
ISDN	2	0,24
IS-5-N	1	1,00

D 9.2 IMDN - IIDN - ISDN

Einfluß sterischer Faktoren bei den Dinitraten

Abb. 14 zeigt den Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurven bei der GC-Aktivierung mit den 3 cyclischen Dinitraten. Die Anzahl der Nitratgruppen pro Molekül ist konstant, es bestehen lediglich Unterschiede in der Konfiguration, so daß sich diese Verbindungen dazu eignen, den Einfluß sterischer Faktoren auf die GC-Aktivität zu untersuchen. Im Vergleich zur Nitratgruppenanzahl sind stereochemische Unterschiede für die GC-Stimulierung von untergeordneter Bedeutung (Abb. 14). Die EC_{50} für die drei Verbindungen variiert nur geringfügig (Tab. 12). Dabei wirkt das IMDN mit 2 Nitratgruppen in endo-Position am stärksten, gefolgt vom IIDN (exo/exo), während das bereits in die Therapie eingeführte ISDN (exo/endo) die höchste EC_{50} aus dieser Gruppe aufweist. Interessanterweise wirkt die Verbindung, deren Nitratgruppen über die sterisch gehinderte endo-Position mit dem Ringsystem verbunden sind, am stärksten.

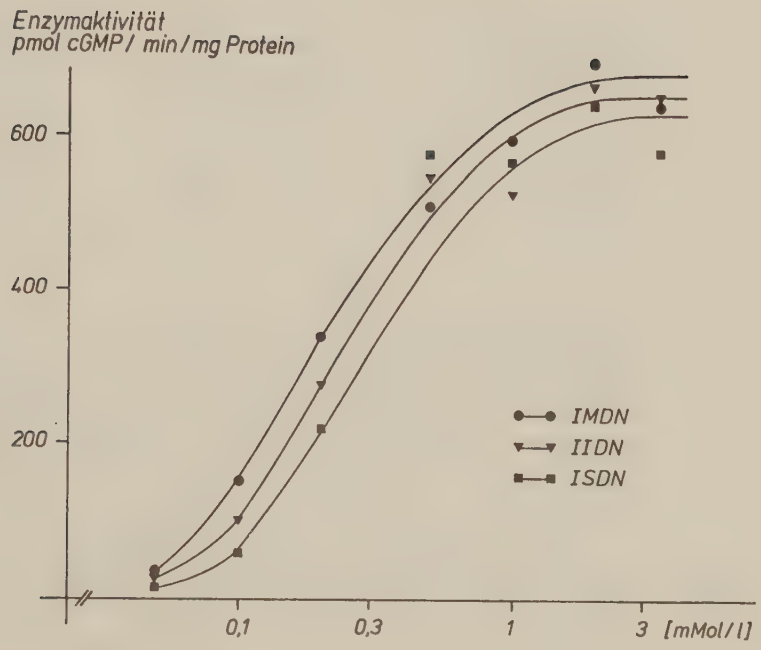


Abb. 14: Konzentrations-Wirkungskurven der drei cyclischen Dinitrate mit unterschiedlicher sterischer Position der Nitratgruppen an den C-Atomen 2 und 5.
IMDN (endo/endo)
IIDN (exo/exo)
ISDN (exo/endo)

Tab. 12: EC_{50} bei 3 cyclischen Dinitraten in Abhängigkeit von der sterischen Position der Nitratgruppen.

Organ. Nitrat	Stellung der Nitratgruppen C-Atom 2/C-Atom 5	EC_{50} (mM)
IMDN	endo / endo	0,20
IIDN	exo / exo	0,24
ISDN	exo / endo	0,28

D 9.3 II-2-N - IS-2-N - IM-2-N - IS-5-N

Einfluß sterischer Faktoren bei den Mononitraten

Auch die Mononitrate lassen sich in ihrer GC-Wirksamkeit nach stereochemischen Gesichtspunkten differenzieren (Abb. 15). Die beiden Verbindungen mit der exo-ständigen Nitratgruppe, II-2-N und IS-2-N, stimulieren die GC bei niedrigeren Konzentrationen als IM-2-N und IS-5-N, deren pharmakophore Gruppe sich in der sterisch gehinderten endo-Position befindet. Offensichtlich spielt aber auch die Stellung der freien Hydroxylgruppen eine modulierende Rolle, da zwischen II-2-N und IS-2-N einerseits und IM-2-N und IS-5-N andererseits Wirkunterschiede bestehen.

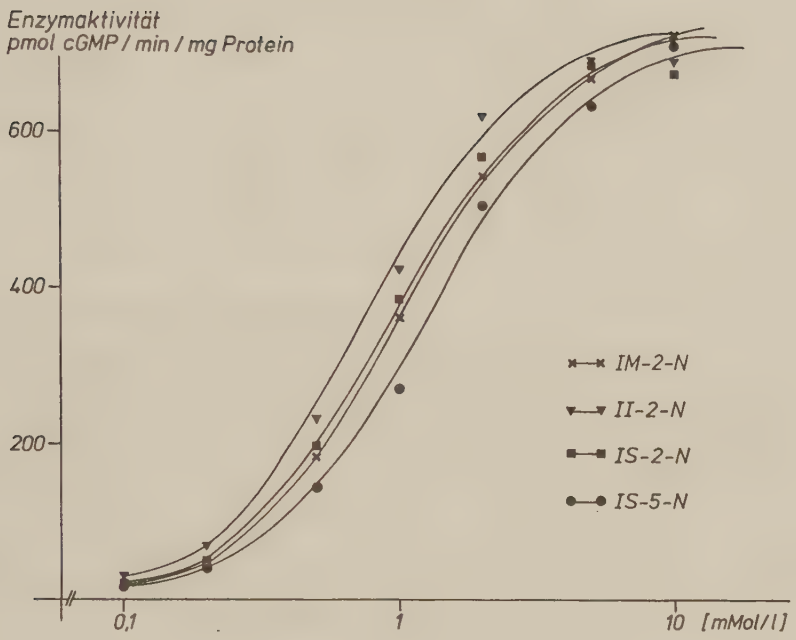


Abb. 15: Konzentrations-Wirkungskurven der 4 cyclischen Mononitrate. Bei II-2-N und IS-2-N befindet sich die Nitratgruppe in exo-Stellung, bei IS-5-N und IM-2-N in endo-Stellung.

Tab. 13: Einfluß der sterischen Anordnung von Hydroxyl- und Nitratgruppe auf die EC_{50} der 4 cyclischen Mononitrate.

Organ. Nitrat	-OH	$-ONO_2$	EC_{50} (mM)
II-2-N	exo	exo	0,68
IS-2-N	endo	exo	0,75
IM-2-N	endo	endo	0,80
IS-5-N	exo	endo	1,00

Auffällig ist der vergleichsweise große Wirkunterschied zwischen IS-5-N und IM-2-M (EC_{50}-Differenz = 0,20 mM), während sich die EC_{50} bei IM-2-N/IS-2-N und IS-2-N/II-2-N nur um 0,05 bzw. 0,07 mM ändert (Tab. 13). Dies entspricht aber auch dem Wirkprofil, das an der nicht gereinigten GC mit jeweils gleichen Nitratkonzentrationen von 1 mM bestimmt wurde (s. D 2, Tab. 6). Auch hier ist der Abstand zwischen IS-5-N und IM-2-N um das Drei- bis Vierfache größer als zwischen den anderen cyclischen Mononitraten.

D 9.4 Essigsäureester von IS-5-N und IS-2-N

Einfluß der Lipophilie

Die Veresterung der freien OH-Gruppe bei IS-5-N und IS-2-N mit Essigsäure verändert die Lage der Konzentrations-Wirkungskurven nur geringfügig (Abb. 16).

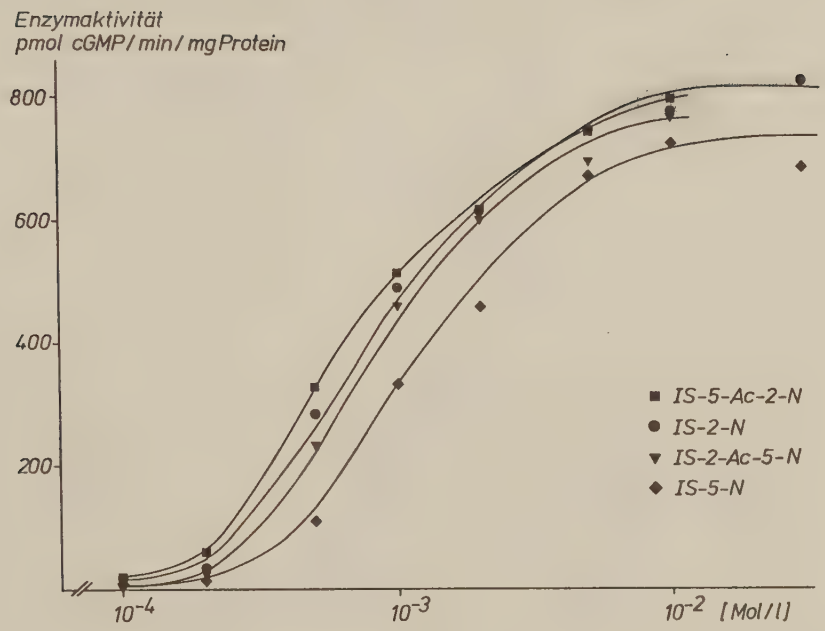


Abb. 16: Konzentrations-Wirkungskurven von IS-2-N, IS-5-N und der Acetylderivate.

Tab. 14: Beeinflussung der EC_{50} durch Veresterung der freien Hydroxylgruppe bei den Mononitraten IS-2-N und IS-5-N.

Organ. Nitrat	EC_{50} (mM)
IS-5-Ac-2-N	0,72
IS-2-N	0,75
IS-2-Ac-5-N	0,80
IS-5-N	1,00

Die durch die Acetylierung bewirkte Linksverschiebung der Kurve ist im Falle des IS-5-N auffallend größer als bei IS-2-N. Dennoch ist auch bei den acetylierten Derivaten die Verbindung mit der exo-ständigen Nitratgruppe (IS-5-Ac-2-N) stärker wirksam als die mit der endo-ständigen (IS-2-Ac-5-N). Die Einführung des Acetylrestes führt zu einer Erhöhung der Lipophilie, wodurch die GC-Wirksamkeit der pharmakophoren Nitratgruppe kaum beeinflußt wird.

D 9.5 Pivalin- und Isovaleriansäureester von IS-5-N

Einfluß von Lipophilie und sterischen Faktoren

Die freie OH-Gruppe in der 2-Stellung des IS-5-N-Moleküls wurde mit Pivalinsäure bzw. Isovaleriansäure verestert. Das Molekulargewicht der beiden Derivate war identisch (MG = 275). Die Konzentrations-Wirkungskurven der beiden Ester wurden nur bis zu einer Konzentration von 1 mM aufgenommen (s. D 8) und zur Ermittlung der EC_{50} rechnerisch extrapoliert. Der Verlauf beider Kurven ist identisch (Abb. 17).

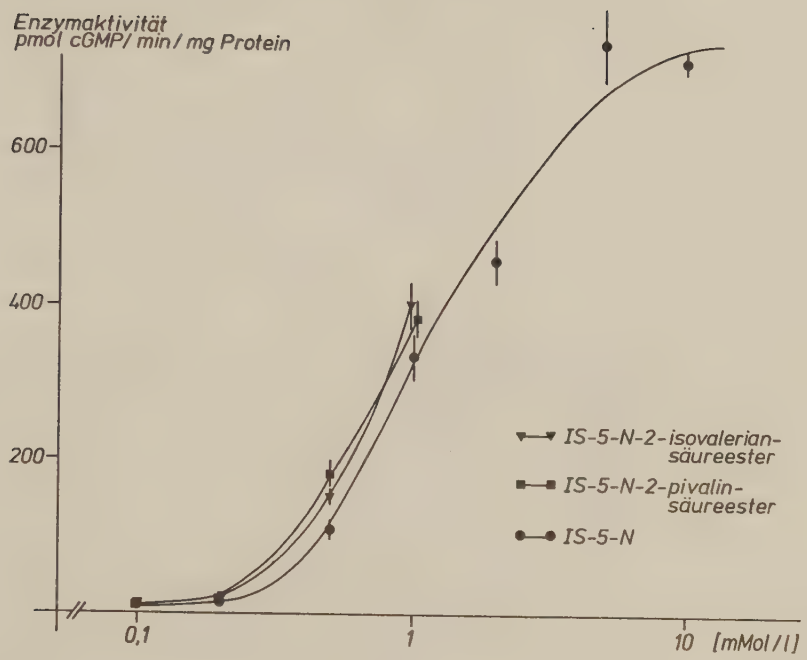


Abb. 17: Konzentrations-Wirkungskurven von IS-5-N und zwei sterisch gehinderten Derivaten.

Tab. 15: Beeinflussung der EC_{50} durch sterische Hinderung bei Derivaten des IS-5-N.

Organ. Nitrat	EC_{50} (mM)
IS-5-N -2-Pivalinsäureester	0,85
IS-5-N -2-Isovaleriansäureester	0,85
IS-5-N	1,00

Die Linksverschiebung der IS-5-N-Kurve liegt etwa im Bereich der Acetylderivate. Die beiden Verbindungen besitzen gleiches Molekulargewicht und eine vergleichbare Lipophilie, unterscheiden sich aber in ihrer räumlichen Struktur. Der Tertiärbutylrest des Pivalinsäurederivates ist noch raumgreifender als der Isopropylrest bei der Isovaleriansäure, so daß die beiden Derivate die sterischen Eigenschaften des IS-5-N verschieden stark verändern. Trotzdem unterscheiden sie sich nicht in ihrer Wirksamkeit am Enzym, und auch die starke Erhöhung der Lipophilie führt im Vergleich zum IS-5-N zu keinem ausgeprägten Effekt.

D 10 Konzentrations-Wirkungskurven von GTN, ISDN und IS-5-N an der GC aus Schweinecarotiden

Um die Übertragbarkeit der an Rattenleber-GC gewonnenen Erkenntnisse auf den Mechanismus der Gefäßrelaxation zu sichern, wurden die Konzentrations-Wirkungskurven eines Trinitrats, Dinitrats und Mononitrats an der GC aus Schweinecarotiden erstellt (Präparation s. C 1.1.4) (Abb. 18).

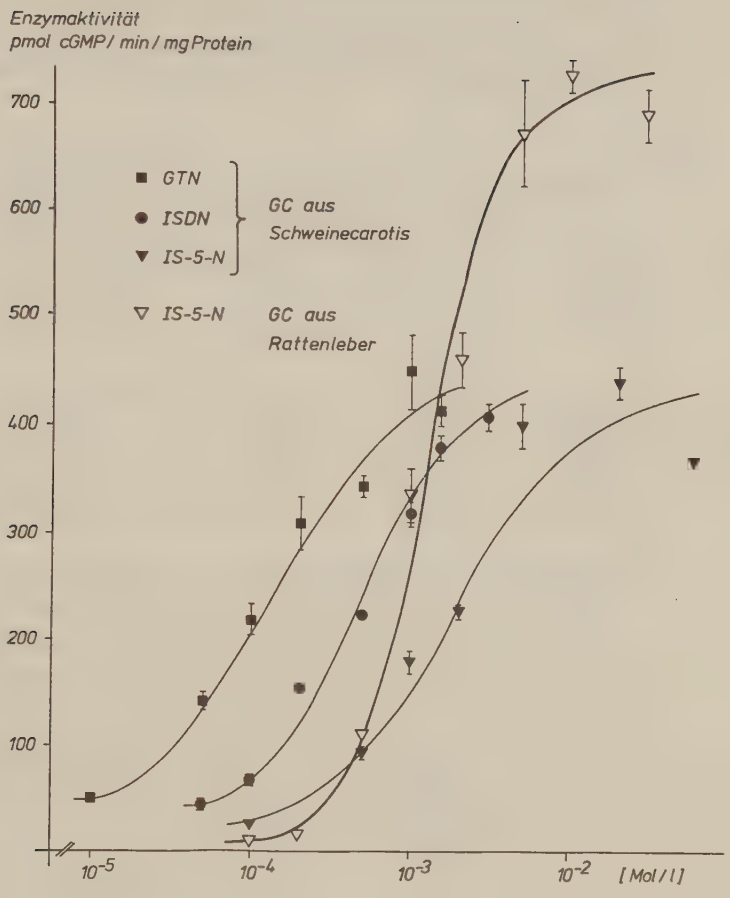


Abb. 18: Konzentrations-Wirkungskurven eines Trinitrats (GTN), Dinitrats (ISDN) und eines Mononitrats (IS-5-N), erstellt an der GC aus Schweinecarotiden. Zum Vergleich ist die Konzentrations-Wirkungskurve von IS-5-N, erstellt an Rattenleber-GC, abgebildet.

Auch hier betrug die im GC-Test eingesetzte Proteinmenge 30 µg. Dem Inkubationsvolumen wurden außer den unter C 1.3 aufgeführten Substanzen 2 mM EGTA hinzugefügt, wodurch die Empfindlichkeit der GC erhöht wurde (s. D 11).

Tab. 16: Vergleich der EC_{50} von 3 Nitraten bei der GC aus Schweinecarotiden und Rattenleber.

Organ. Nitrat	n=Anzahl der Nitratgruppen pro Molekül	EC_{50} Carotis (mM)	EC_{50} Rattenleber (mM)
GTN	3	0,092	0,06
ISDN	2	0,36	0,24
IS-5-N	1	1,51	1,00

Auch hier bewirkt jede weitere Nitratgruppe eine Verminderung der EC_{50} etwa um den Faktor 4, wobei allerdings die maximal erreichbare Aktivierung wesentlich unter derjenigen der Rattenleber-GC liegt. Das Wirkprofil sowie Qualität und Quantität der Struktur-Wirkungsbeziehungen sind jedoch gleich. Der einzige Unterschied besteht in der geringeren Empfindlichkeit der GC-Präparation aus Carotisgewebe.

D 11 Einfluß von EGTA auf die Stimulierbarkeit der GC

Calciumionen führen bereits im nanomolaren Bereich zu einer mehr als 50%igen Hemmung der GC-Stimulation durch Nitrokörper (89). Die GC-Präparation aus Carotisgewebe reagierte weitaus weniger empfindlich auf die Stimulation mit organischen Nitraten als die Rattenleber-GC, wobei möglicherweise ein per se höherer Gehalt an Calciumionen eine Rolle spielt.
Der Zusatz von 2 mM EGTA erhöhte die Aktivierbarkeit um mehr als das Doppelte (Abb. 19), ließ aber die Basalaktivität unbeeinflußt.

EGTA bildet einen sehr stabilen Calciumkomplex, bindet dafür aber den zur Stimulation benötigten Kofaktor Magnesium weniger stark als EDTA, wie die Stabilitätskonstanten log K_{stab} in Tab. 17 zeigen.

Tab. 17: Logarithmen der Stabilitätskonstanten log K_{stab} der EGTA- und EDTA-Komplexe von Ca^{2+} und Mg^{2+} (97).

	log K_{stab}	
	Ca^{2+}	Mg^{2+}
EGTA	11,0	5,2
EDTA	10,7	8,7

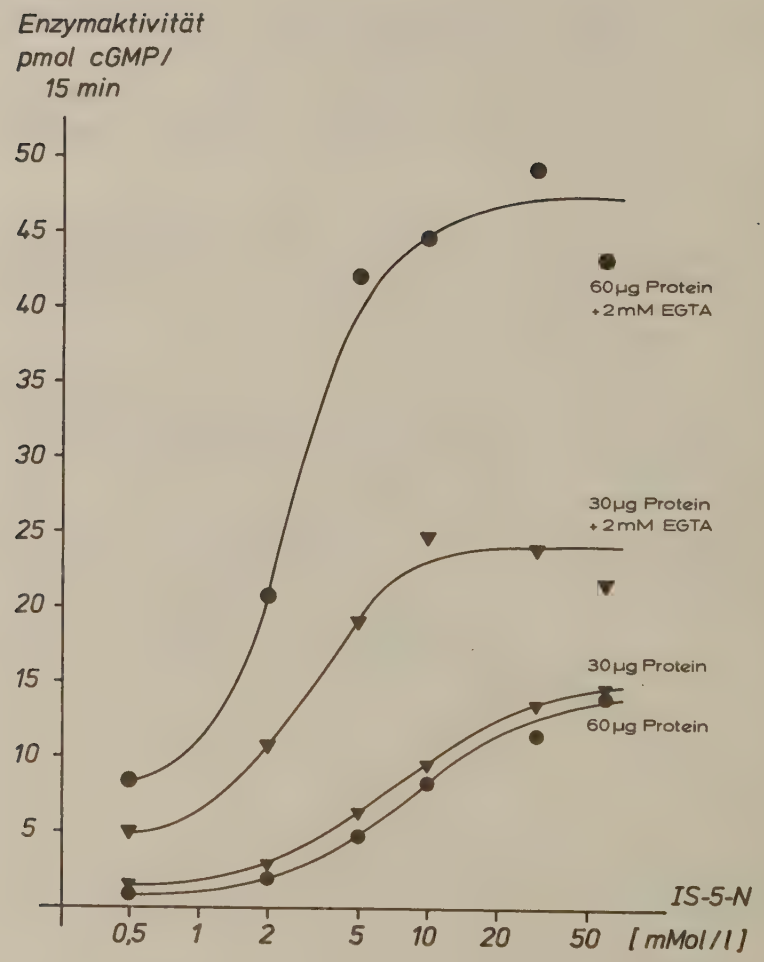


Abb. 19: Proteinabhängigkeit der GC-Aktivität (Carotisgewebe) unter Einfluß von EGTA.

Aus diesem Grunde eignet sich EGTA in dem beschriebenen Reaktionsansatz besser zur Ca^{2+}-Komplexierung als EDTA. Interessanterweise wird durch EGTA auch die in D 5 beschriebene Proteinabhängigkeit der GC-Aktivität verändert. Eine mögliche Erklärung für die geringere Aktivität höher konzentrierter GC-Präparationen ist der in diesem Fall stärkere Einfluß inhibierender Faktoren, wie z.B. verschleppter Calciumionen. Durch den Zusatz eines Überschusses an EGTA wird die Hemmung aufgehoben und die Enzymaktivität nimmt linear mit der Proteinkonzentration zu, wie die beiden oberen Kurven zeigen. Auch für Präparationen aus Rattenleber konnte ein steigernder Effekt des EGTA von 25-50% auf die Stimulation mit organischen Nitraten nachgewiesen werden. Um die GC-Wirkung der einzelnen Substanzen ausreichend differenzieren zu können, war allerdings nur bei Carotispräparationen ein Zusatz von 2 mM EGTA nötig.

D 12 Gegenüberstellung des Wirkprofils der organischen Nitrate an der GC und am Langendorff-Herzen - unterschiedlicher Einfluß von Lipophilie und sterischen Faktoren

Tab. 18: Gegenüberstellung der vasodilatatorischen (isoliert perfundiertes Langendorff-Herz) und GC-aktivierenden Wirksamkeit unterschiedlicher organischer Nitrate.

Organisches Nitrat	50%ige Steigerung des koronaren Flusses (mM)	EC_{50} der GC-Stimulation (mM)
GTN	0,08	0,06
ISDN	0,15	0,24
IS-2-N	1,58	0,75
IS-5-N	17,00	1,00
IS-5-N -2-Isovaleriansäureester	0,036	0,85
IS-5-N -2-Pivalinsäureester	0,075	0,85

Zur Messung der durch organische Nitrate hervorgerufenen Gefäßdilatation eignet sich das Modell des isoliert perfundierten Langendorff-Herzens (3) Die Geschwindigkeit der koronaren Perfusion bzw. deren pharmakologische Steigerung ist ein direktes Maß für den Tonus der Koronararterien, der durch die organischen Nitrate herabgesetzt wird. In Tab. 18 sind für einige Nitrate die Ergebnisse am Langendorff-Herzen und an der GC gegenübergestellt (74). Die Derivatisierung mit Isovaleriansäure bzw. Pivalinsäure verändert die GC-Aktivierung durch IS-5-N nur unerheblich. Im Gegensatz dazu wird die vasodilatatorische Wirkung im Falle der Isovaleriansäure um das 400-fache und im Falle der Pivalinsäure um das 200-fache gesteigert. Dies

liegt daran, daß bei Untersuchungen an intakten, funktionierenden Organen, wie dem Langendorff-Herzen, Verteilungs- und Transportvorgänge eine große Rolle spielen. Die Bioverfügbarkeit am Wirkort hängt von der Geschwindigkeit ab, mit der die Substanzen Membranbarrieren passieren können. Die pharmakokinetische Phase der Arzneistoffwirkung ist bei diesem Modell also von großer Bedeutung. Durch Erhöhung der Lipophilie, wie sie die Veresterung mit Fettsäuren des beschriebenen Typs bewirkt, wird wegen der verbesserten Membrangängigkeit die Permeation der Substanzen zum Wirkort beschleunigt. Dies erklärt deren erhöhte Wirksamkeit am Langendorff-Herzen. Außerdem zeigt sich der Einfluß sterischer Momente darin, daß das Pivalinsäurederivat um den Faktor 2 stärker gefäßwirksam ist als das Isovaleriansäurederivat: Der raumgreifende Tertiärbutylrest der Pivalinsäure verlangsamt den Transport durch Membranen infolge einer sterischen Hinderung.
Der Einfluß der Lipophilie auf die Steigerung des Koronarflusses wird auch in Abb. 20 deutlich.

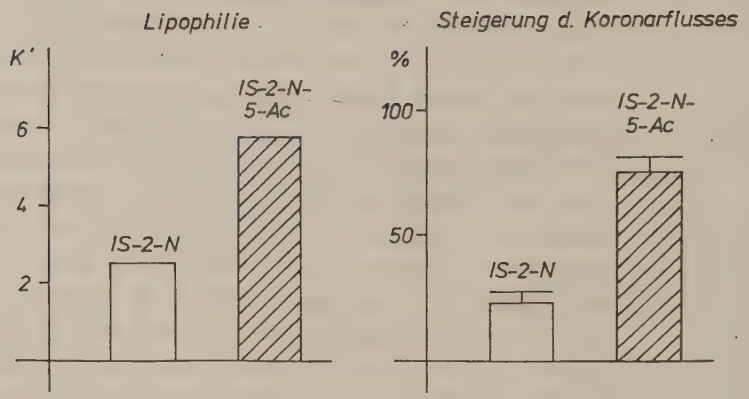


Abb. 20: Steigerung der Lipophilie (von k' =2,07 auf 5,86) und Gefäßwirksamkeit (von 23,3% auf 73,7%) durch Acetylierung von IS-2-N in 5-Stellung. Die Wirkstoffkonzentration betrug 732 µM (99).

K' als Maß für die Lipophilie ist der sog. Kapazitätsfaktor, der sich aus den Retentionszeiten der organischen Nitrate an einer HPLC-Säule berechnet (73). Durch die Veresterung mit Essigsäure steigt der Kapazitätsfaktor als Parameter für die Lipophilie von 2,07 auf 5,86. Gleichzeitig erhöht sich die koronardilatatorische Wirkung überproportional um 23,3% auf 73,7%. Die entsprechenden Konzentrations-Wirkungskurven an der GC (D 9.4) zeigen, daß hier Lipophilie und sterische Faktoren eine untergeordnete Rolle spielen, weil bei der Wirkung vor Ort gewebeabhängige Transport- und Verteilungsprozesse entfallen.

D 13 Einfluß unterschiedlicher Thiole auf den Nitratabbau und die Aktivierung der GC

Neben der Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehungen an der GC war das zweite Ziel der vorgelegten Arbeit, den Nitratabbau unter Einfluß von Cystein und anderen SH-Gruppen tragenden Verbindungen zu messen. Aus der Menge an abgebautem organischen Nitrat läßt sich indirekt auf die Konzentration an freigesetztem NO schließen. Eine Gegenüberstellung mit der unter den gleichen Bedingungen ermittelten GC-Aktivität sollte Aufschluß darüber geben, ob zwischen NO-Freisetzung und GC-Stimulierung eine Korrelation besteht oder ob bei der subzellulären Wirkungsvermittlung der organischen Nitrate weitere bisher nicht bekannte biochemische Zwischenschritte eine Rolle spielen.

D 13.1 Abbau von GTN und gleichzeitige Aktivierung der GC in Gegenwart von Cystein, Cysteinderivaten und anderen Thiolen

Zur Bestimmung des Nitratabbaus wurde GTN verwandt, das im Vergleich zu den Di- und Mononitraten eine größere Abbaugeschwindigkeit aufwies und so bereits nach einer Inkubation von 60 min ausreichend hohe Werte lieferte. Die eingesetzte Konzentration von 0,05 mM lag im Bereich der EC_{50}. Die Thiole wurden unter dem Gesichtspunkt einer systematischen Abwandlung des Cysteinmoleküls ausgewählt, wie Abb. 21 zeigt.

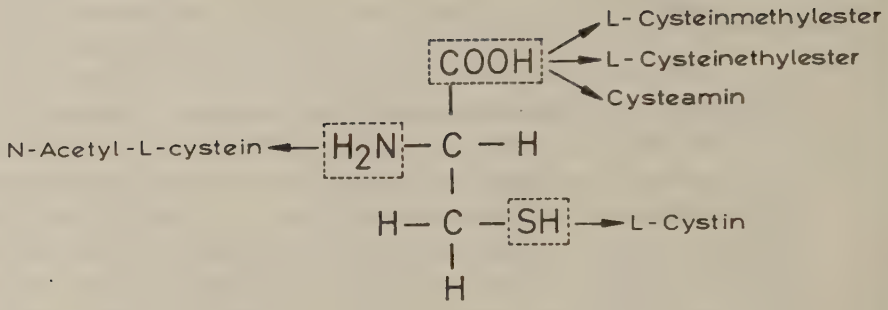
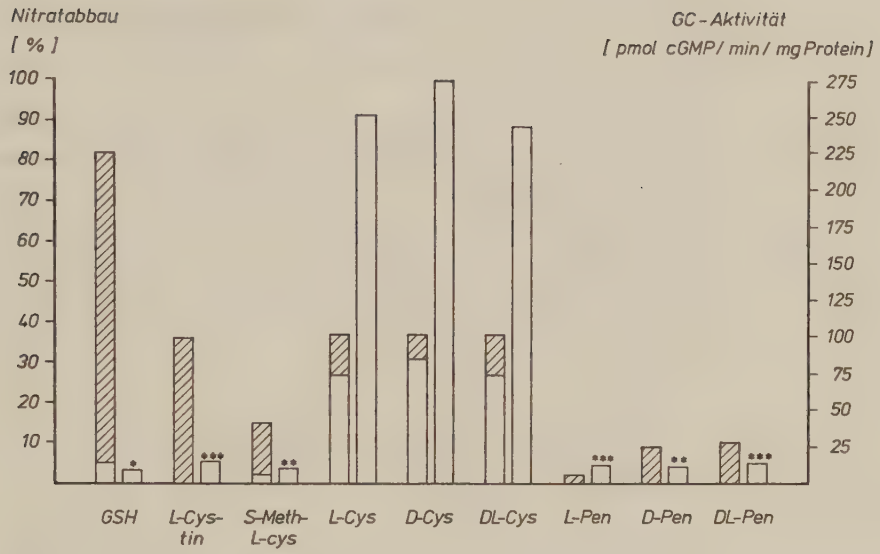


Abb. 21: Cystein mit funktionellen Gruppen und entsprechenden Derivaten.

Bei selektiver Blockierung einzelner funktioneller Gruppen sollte deren Bedeutung für den Nitratabbau und die GC-Aktivierung deutlich werden. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 22 + 23 dargestellt. Die Säulendiagramme zeigen sowohl den Abbau von GTN (jeweils linke Säule) und die Aktivierung der GC (jeweils rechte Säule).


Nitratabbau
[%]
GC - Aktivität
[pmol cGMP/ min / mg Protein]
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
275
250
225
200
175
150
125
100
75
50
25
GSH
L-Cys-tin
S-Meth-L-cys
L-Cys
D-Cys
DL-Cys
L-Pen
D-Pen
DL-Pen

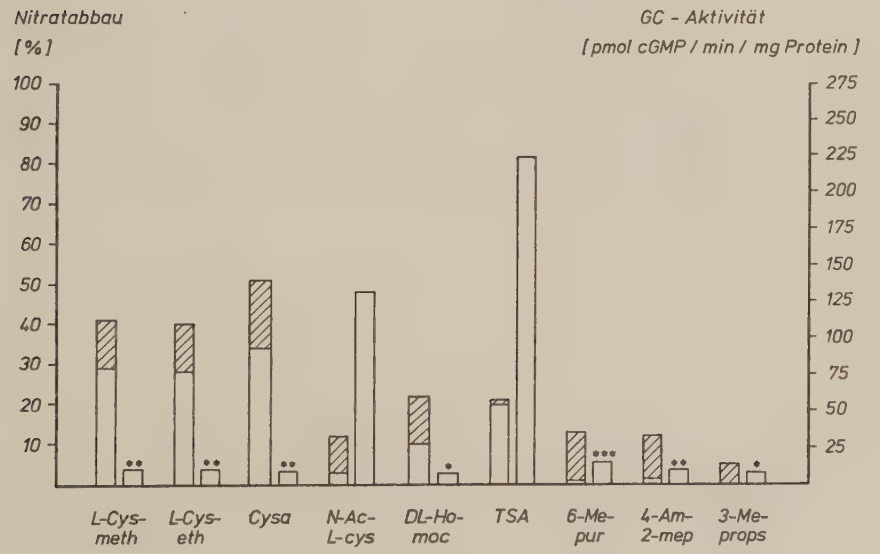

Nitratabbau
[%]
GC - Aktivität
[pmol cGMP / min / mg Protein]
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
275
250
225
200
175
150
125
100
75
50
25
L-Cys-meth
L-Cys-eth
Cysa
N-Ac-L-cys
DL-Ho-moc
TSA
6-Me-pur
4-Am-2-mep
3-Me-props

Abb. 22 und 23

Abb. 22 und 23:

Abbau von GTN (linke Säule) und Aktivierung der GC (rechte Säule) in Gegenwart verschiedener Thiole (Abkürzungen s. Text).
Linke Säulen: Prozentualer Abbau von 0,05 mM GTN (nicht schraffierter Teil) in Gegenwart der auf der Abszisse angegebenen Thiole und nach zusätzlicher Gabe von 30 µg GC-Fraktion (schraffierter Teil).
Rechte Säulen: Aktivierung der GC in Gegenwart von 0,05 mM GTN und verschiedenen Thiolen.
Signifikanter Anstieg gegenüber der Basalaktivität (6 pMol cGMP/min/mg Protein):

* $p < 0,05$
** $p < 0,01$
*** $p < 0,0005$.

Eine überzeugende GTN-Aktivierung der GC gelang nur mit L-, D- und DL-Cystein, Thiosalicylsäure und N-Acetyl-L-cystein. Alle anderen Thiole erhöhten die Basalaktivität (6 pMol cGMP/min/mg Protein) in Gegenwart von GTN nur geringfügig, wenn auch signifikant, wie die Abbildungen 22 und 23 zeigen. Dieser Effekt kann möglicherweise auf die in D 3 beschriebene thiolunabhängige GC-Aktivierung durch GTN zurückgeführt werden.

D 13.1.1 Enzymatischer Abbau von GTN - Bedeutung der SH-Gruppe

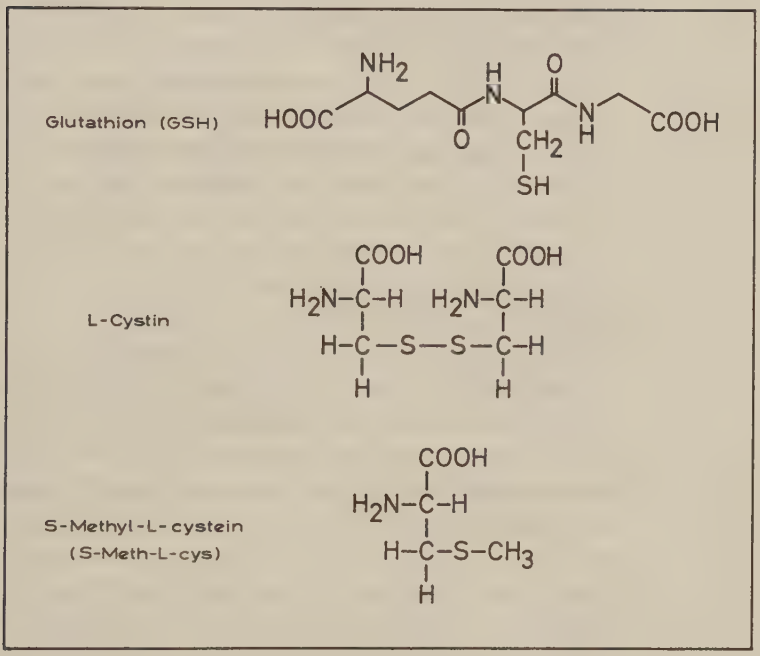


Abb. 24

Die Inkubation mit Enzym führte in der Regel zu einem um 1-15% erhöhten Abbau (schraffierte Fläche). Ein vergleichbarer Wert (9,5%) wurde ermittelt, wenn die zu untersuchende Lösung nur GTN und die GC-Fraktion enthielt. Ausnahmen bilden GSH und L-Cystin (Abb. 24). Ohne Zusatz von Enzym ist L-Cystin nicht in der Lage, GTN abzubauen, aber in Gegenwart der GC-Fraktion steigt die Metabolisierungsrate auf 36% des Kontrollwertes. Es ist denkbar, daß SH-Gruppen regenerierende Enzyme, die als unvermeidbare Bestandteile der GC-Präparation Disulfidbrücken spalten können, L-Cystin zu L-Cystein reduzieren, wodurch der Nitratabbau in Gang gesetzt wird. Beim GSH, das das zentrale Cysteinmolekül peptidartig gebunden enthält, ist der Anstieg bei Zusatz von Enzym ebenfalls ungewöhnlich hoch (82%). GSH fungiert als Kosubstrat zur Glutathion-S-transferase (E.C. 2.5.1.18), die im Lebergewebe in hohen Konzentrationen vorkommt. Da GSH mit 5 mM im Überschuß vorliegt (GTN: 0,05 mM), kommt es zu einer überproportionalen Stimulierung der enzymatischen Metabolisierung des Nitroglycerins (4, 31). Eine irreversible Blockierung der SH-Gruppe, wie sie im S-Methyl-L-cystein (Abb. 24) vorliegt, läßt die Abbaurate praktisch auf Null bzw. auf den rein enzymatisch bedingten Wert sinken. Alle drei Verbindungen erhöhen trotz der im Falle des GSH extrem hohen NO-Freisetzung die Basalaktivität nur unwesentlich.

D 13.1.2 Einfluß der Chiralität

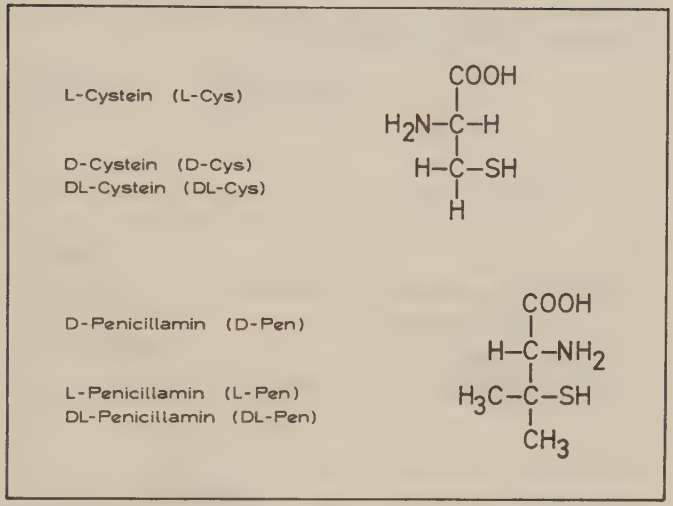


Abb. 25

Cystein (Abb. 25) und Penicillamin (Abb. 25), das sich von Cystein durch zwei zusätzliche ß-Methylgruppen unterscheidet, wurden in Form der reinen Enantiomere und als Racemat untersucht. Dabei wiesen die optischen Antipoden in ihrer Fähigkeit, GTN abzubauen, und als Koaktivator der GC nur unwesentliche Unterschiede auf. Die Abbaurate der Cysteinenantiomere und des Racemats liegt bei 37%, die Stimulationshöhe in Gegenwart von 0,05 mM GTN bei 250 pMol cGMP/min/mg Protein, wobei das D-Cystein diesen Wert etwas überschreitet (275 pMol cGMP/min/mg Protein). Die zwei optischen Isomere des Penicillamins und deren Racemat zeigen ohne GC-

Fraktion keine nitratabbauende Potenz und beeinflussen die Basalaktivität kaum. Eine Abhängigkeit von der Chiralität der Verbindung kann also weder beim Nitratabbau noch bei der GC-Aktivierung festgestellt werden.

D 13.1.3 Bedeutung der Carboxylgruppe

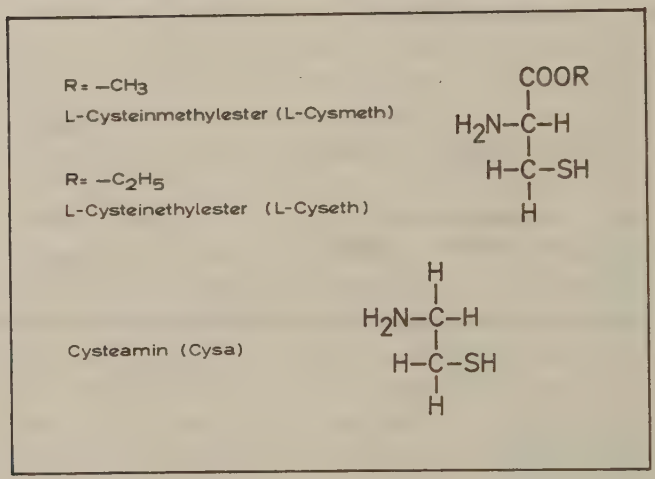


Abb. 26

Der Methyl- und der Ethylester des Cysteins (Abb. 26) bewirken einen Nitratabbau von 41% bzw. 40%, wenn das Inkubationsvolumen die GC-Fraktion enthält. Dieser Wert liegt im Bereich des Cysteins, doch ist bei den beiden Estern die Fähigkeit zur Stimulierung der GC in Gegenwart von 0,05 mM GTN bis auf eine geringe Restaktivierbarkeit verlorengegangen. Auch hier resultiert trotz ausreichender NO-Freisetzung keine korrelierende

GC-Aktivierung.
Ähnlich verhält sich das biogene Amin des Cysteins, das Cysteamin (GTN-Abbau = 51%, GC-Aktivität = 9,3 pMol cGMP/min/mg Protein). Die freie Carboxylgruppe ist bei der reduktiven Denitrierung des GTN nicht essentiell, wohl aber bei der Aktivierung der GC.

D 13.1.4 Bedeutung der Aminogruppe

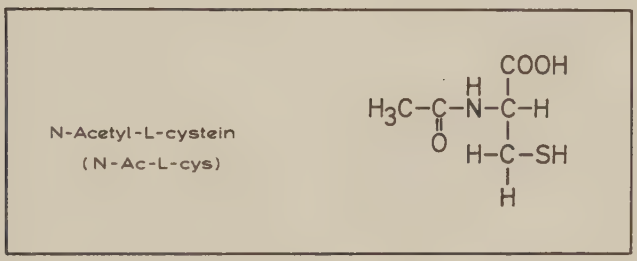


Abb. 27

Eine Blockierung der Aminogruppe durch Acetylierung führt zu einer drastischen Verminderung der denitrierenden Potenz (3,0% ohne Enzym, 12% mit Enzym). Dennoch ist N-Acetyl-L-cystein (Abb. 27) neben Cystein und Thiosalicylsäure das einzige Thiol, das einen überzeugenden Anstieg der GC-Aktivität bewirkt (131 pMol cGMP/min/mg Protein). Auch dies spricht gegen die NO-Freisetzung als ausschließlich entscheidendem Faktor der GC-Stimulierung durch organische Nitrate. Die in der vorgelegten Arbeit zum ersten Mal gezeigte hohe GC-Wirksamkeit des N-Acetyl-L-cysteins ist von besonderer Bedeutung, betrachtet man sie vor dem Hintergrund

klinischer Untersuchungen, die Horowitz und Mitarbeiter 1983 durchführten (32). In einer Gruppe von 10 Patienten konnte gezeigt werden, daß die hämodynamischen Effekte von GTN (u.a. die Senkung des mittleren arteriellen Blutdrucks) in Gegenwart von N-Acetyl-L-cystein um das Dreifache ansteigen. Da N-Acetyl-L-cystein häufig als Mukolytikum eingesetzt wird, kann eine Arzneimittelinteraktion im Sinne einer verstärkten GTN-Wirkung nicht ausgeschlossen werden.

D 13.1.5 Thiole mit stereochemisch variierten Amino- und Carboxylgruppen

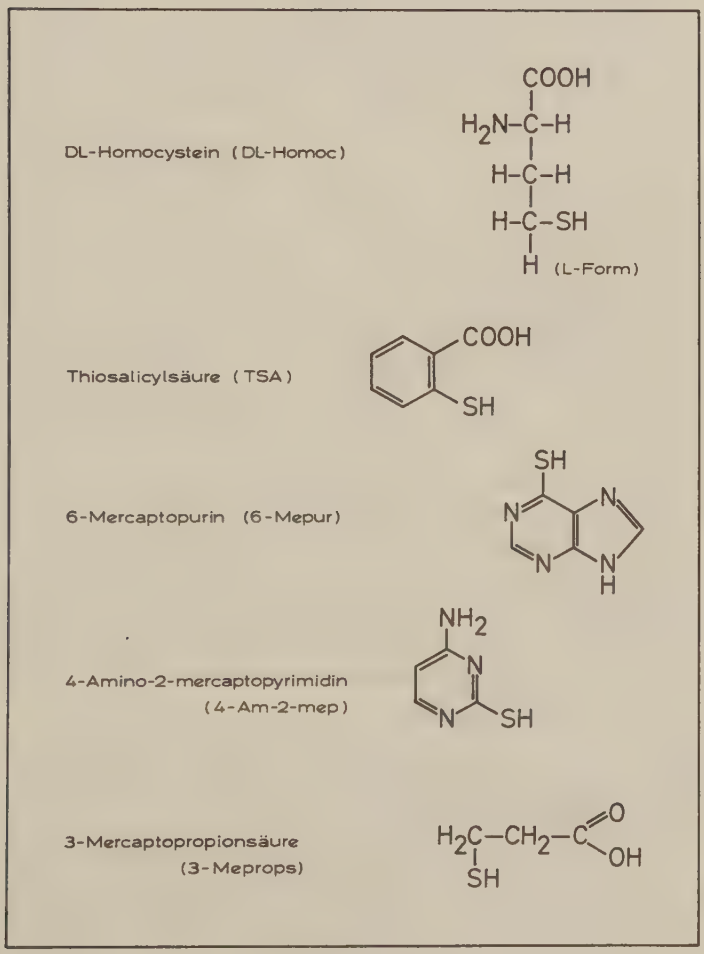


Abb. 28

Die Einführung einer weiteren Methylengruppe in das Cysteinmolekül im Falle des DL-Homocysteins (Abb. 28) resultiert in einem vollständigen Verlust der koaktivierenden Eigenschaften, obwohl die Abbaurate von GTN vergleichsweise hoch bleibt (22% mit Enzym, 10% ohne Enzym). Die Thiosalicylsäure (Abb. 28) zeigt bei 20% GTN-Abbau eine GC-Aktivierung von 222 pMol cGMP/min/mg Protein und liegt damit in ihrer GC-Wirksamkeit nur wenig unter dem L-Cystein (250 pMol cGMP/min/mg Protein). Dies legte die Prüfung der 3-Mercaptopropionsäure (Abb. 28) nahe, in der ebenfalls, wenn auch in einem frei drehbaren, aliphatischen System, die Thiolfunktion über 2 C-Atome mit der Carboxylgruppe verbunden ist. Trotz dieser strukturellen Ähnlichkeit baut die 3-Mercaptopropionsäure weder GTN ab (0% ohne Enzym, 4,6% mit Enzym), noch führt sie zusammen mit GTN zu einer nennenswerten Erhöhung der Basalaktivität. Die vom Purin- bzw. Pyrimidingerüst abgeleiteten Verbindungen 6-Mercaptopurin (Abb. 28) und 4-Amino-2-mercaptopyrimidin (Abb. 28) haben mit dem Cystein nur noch den basischen Stickstoff und die Thiolfunktion gemeinsam. Die Carboxylgruppe fehlt. Dies hat zur Folge, daß die GC-Aktivierung und der Nitratabbau kaum über den Kontrollen liegen. 6-Mercaptopurin wird klinisch bei Leukämie als antimetabolisch wirksames Cytostatikum eingesetzt.

D 14 Zeitkinetik des Abbaus von GTN in Gegenwart von Cystein

Um die Kinetik des thiolinduzierten Nitratabbaus zu untersuchen, wurde GTN als Testsubstanz gewählt, das wegen seiner hohen Umsatzgeschwindigkeit schon nach relativ kurzen Inkubationszeiten ausreichend hohe und sehr gut reproduzierbare Werte lieferte. Der Ansatz enthielt nur 0,05 mM GTN und 50 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,5). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 mM Cystein zu den bereits im Wasserbad (37°C) befindlichen Proben

gestartet. Vorversuche hatten ergeben, daß der GTN-Abbau durch Cystein schon bei Raumtemperatur beginnt und nach etwa 10 Minuten bereits im Bereich von 7-8% des Ausgangswertes liegt. Die Kontrollen wurden demzufolge unmittelbar nach Cysteinzusatz auf Trockeneis gesetzt.

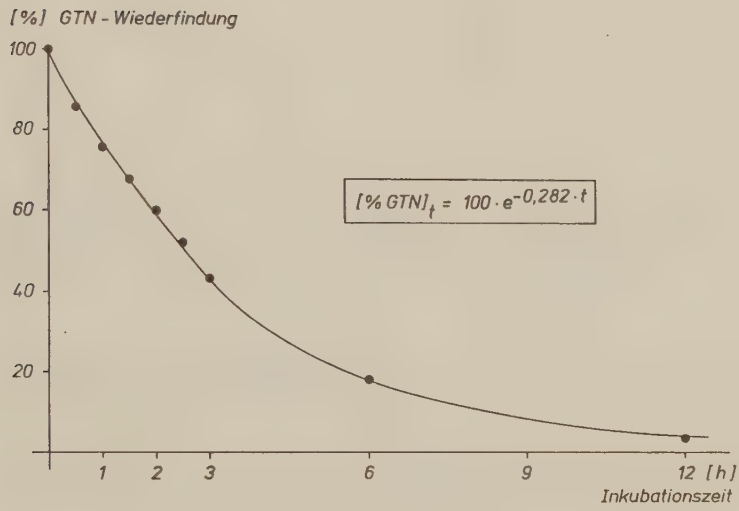


Abb. 29: Exponentieller zeitlicher Verlauf des GTN-Abbaus (0,05 mM Ausgangskonzentration) in Gegenwart von 5 mM Cystein.

Der Abbau des GTN folgt dem Zeitgesetz für eine Reaktion erster Ordnung, d.h. die Konzentration c des Nitrats nimmt exponentiell mit der Zeit ab (Abb. 29):

$$-\frac{dc}{dt} = kc$$

Durch Umformen erhält man:

$$c = c_o \cdot e^{-kt}$$

$$-\ln \frac{c}{c_o} = k \cdot t$$

$$\ln \frac{c_o}{c} = k \cdot t$$

$$k = \frac{1}{t} \cdot \ln \frac{c_o}{c}$$

Hierbei entspricht c_o der Ausgangskonzentration von 100% bzw. 1. Durch Einsetzen des 3-Stunden-Wertes (42,9% Wiederfindung) ergibt sich für die Geschwindigkeitskonstante des GTN-Zerfalls:

$$k = \frac{1}{3} \cdot \ln \frac{1}{0,429} \quad (h^{-1})$$

$$k = 0,282 \quad (h^{-1})$$

Daraus läßt sich die Halbwertszeit berechnen, für die gilt:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{0,282} \quad (h)$$

$$t_{1/2} = 2,46 \quad (h)$$

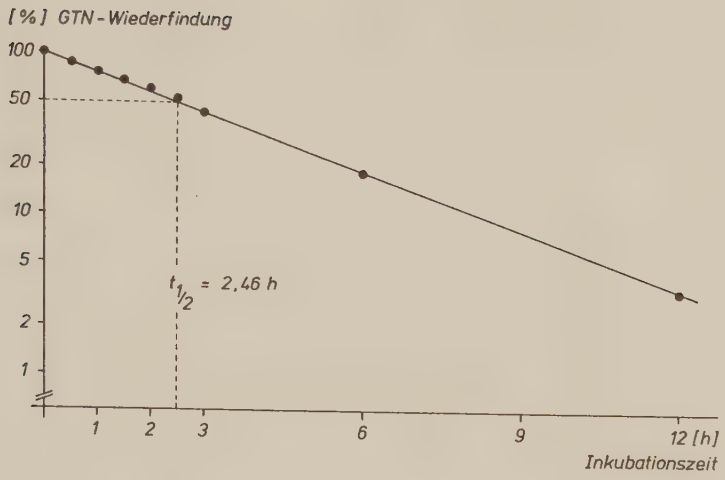


Abb. 30: Linearisierte Zeitkinetik des GTN-Abbaus mit Halbwertszeit $t_{1/2}$.

Der so errechnete und der graphisch bestimmte Wert (s. Abb. 30) sind identisch. Da an der Reaktion zwei Molekülarten (Cystein und GTN) beteiligt sind, stimmen Molekularität (bimolekular) und Reaktionsordnung nicht überein. Cystein liegt jedoch in 100-fachem Überschuß vor, so daß sich praktisch nur die Konzentration des GTN merklich ändert. Bei dem Zerfall des GTN handelt es sich also um eine pseudomonomolekulare (oder kryptobimolekulare) Reaktion erster Ordnung.

D 15 Kinetik des GTN-Abbaus in Abhängigkeit von der Cysteinkonzentration

Die Beeinflussung des GTN-Abbaus durch steigende Cysteinkonzentrationen zeigt Abb. 31.

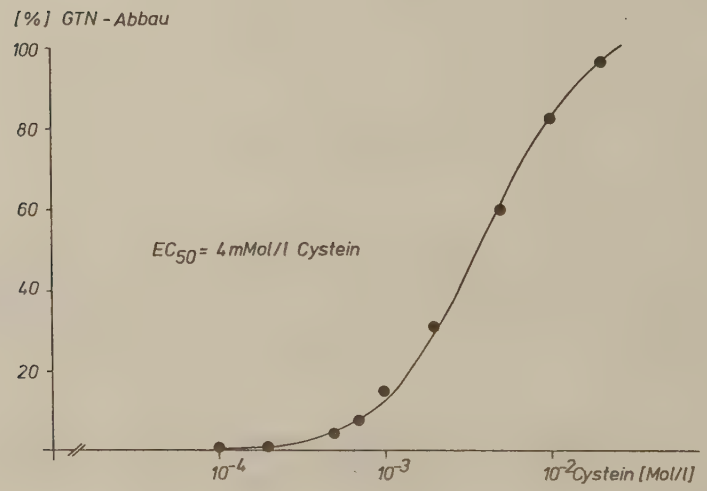


Abb. 31: Kinetik des GTN-Abbaus (0,05 mM Ausgangskonzentration) in Abhängigkeit von der Cysteinkonzentration. Inkubationsdauer: 3 h.

0,05 mM GTN wurden bei den angegebenen Cysteinkonzentrationen inkubiert, die Wiederauffindung gemessen und auf den Nitratabbau umgerechnet. Die Inkubationsdauer betrug 3 h, um die denitrierende Wirksamkeit auch geringer Mengen Cystein zu erfassen. Unter den beschriebenen Bedingungen ergibt sich ein sigmoider Kurvenverlauf, wie er für Konzentrations-Wirkungskurven typisch ist. Die EC_{50} beträgt 4 mM Cystein. Die Schwellenkonzentration liegt bei etwa 0,2 mM Cystein.

D 16 Aktivierung der GC durch GTN in Abhängigkeit von der Cysteinkonzentration - Beziehung zum cysteinabhängigen GTN-Abbau

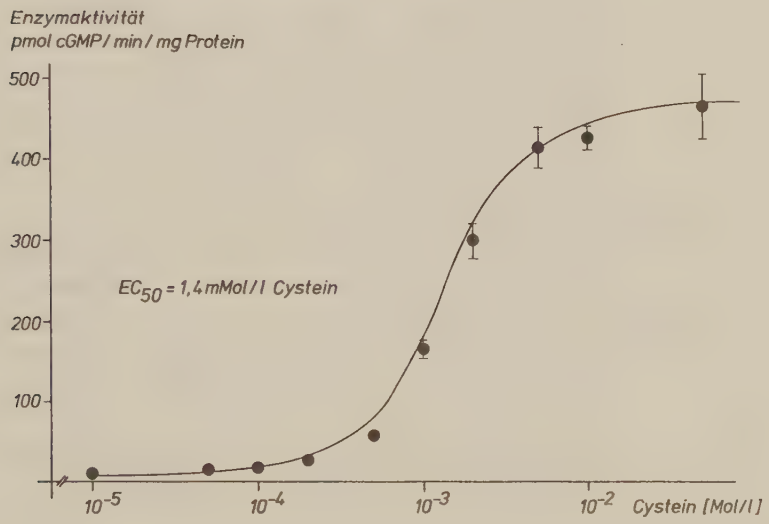


Abb. 32: Aktivierung der GC durch 0,05 mM GTN in Abhängigkeit von der Cysteinkonzentration. Inkubationsdauer: 15 min.

Abb. 32 zeigt die GC-Aktivierung durch 0,05 mM GTN in Abhängigkeit von steigenden Cysteinkonzentrationen. Die EC_{50} beträgt 1,4 mM Cystein, die Schwellenkonzentration liegt bei 0,2 mM Cystein. Der GC-Test wurde, wie in C 1.3 beschrieben durchgeführt, d.h. die Inkubationsdauer betrug 15 Minuten. Ein direkter Vergleich

mit dem GTN-Abbau, der nach 3 h Inkubation bestimmt wurde, ist daher nur bedingt möglich und läßt folgende Aussagen zu:

1) Bei beiden Kinetiken ergibt sich ein sigmoider Kurvenverlauf, d.h. sowohl der GTN-Abbau als auch die GC-Aktivierung folgen einer strengen Konzentrations-Wirkungsbeziehung.
2) Die Schwellenkonzentration liegt sowohl bei der GC-Aktivierung als auch beim GTN-Abbau im Bereich von 0,2 mM Cystein.
3) Der Maximaleffekt wird in beiden Fällen bei etwa 30 mM Cystein erreicht.
4) Der steilere Kurvenverlauf der GC-Aktivität ist möglicherweise bedingt durch die Anwesenheit nitratabbauender Enzyme (E.C. 2.5.1.18) in der GC-Fraktion, deren NO-freisetzendes Potential bei der Zerfallskurve von GTN nicht erfaßt ist. Hier wurde ohne Enzym nur in Gegenwart von Cystein inkubiert, um die gleichzeitige Messung zweier voneinander unabhängiger Abbauvorgänge zu vermeiden.

Diese Punkte legen den Verdacht auf eine direkte quantitative Beziehung zwischen cysteinbedingtem Abbau des GTN und der gleichzeitigen Stimulierung der GC nahe.

D 17 GC-Aktivität bei gleichzeitiger Gegenwart von GSH und L-Ascorbinsäure

Untersuchungen von Ignarro und Gruetter (24, 27) haben gezeigt, daß eine Stimulation der GC durch Natriumnitrit (3 mM) möglich ist, wenn der Reaktionsansatz L-Ascorbinsäure (5 mM) enthält. Amylnitrit verhält sich genauso, wobei in beiden Fällen auch Thiole wie Cystein oder Penicillamin eine kostimulierende Wirkung haben. Wie in D 13 gezeigt, wird GTN im GC-Test unter GSH-Zusatz zu mehr als 80% abgebaut, ohne daß eine entsprechende Aktivierung des Enzyms folgt. Dies könnte an ei-

ner zu schnellen Weiterreaktion des NO liegen, im Sinne einer Oxidation zu NO_2 beispielsweise. Der Zusatz der stark reduzierend wirkenden L-Ascorbinsäure (L-Ascorb) sollte zeigen, ob eine derart massive Beeinflussung des biochemischen Redoxmilieus eine Stimulation der GC durch GSH und GTN möglich macht.

Tab. 19: GC-Aktivierung durch GTN in Gegenwart von L-Ascorbinsäure (L-Ascorb) und GSH.

GC-Aktivität in pMol cGMP/min/mg Protein				
Basal	0,05 mM GTN 5 mM GSH	0,05 mM GTN 5 mM L-Ascorb.	0,05 mM GTN 5 mM L-Ascorb. 5 mM GSH	0,05 mM GTN 5 mM Cystein
13,7 ±0,9	47,9 ±2,8	16,1 ±0,3	15,3 ±0,4	258 ±10,1

GTN wurde in einer Konzentration von 0,05 mM eingesetzt.

Zwar ist die Basalaktivität durch Zusatz von GSH und GTN leicht erhöht (um das Dreifache), andererseits ist die völlige Wirkungslosigkeit einer Kombination aus GSH und Ascorbinsäure eindeutig.

D 18 GC-Aktivität bei gleichzeitiger Gegenwart von GSH und katalytischen Mengen Cystein

Es wurde ein weiterer Versuch unternommen, das hohe NO-freisetzende Potential von GSH in eine Aktivierung des Enzyms umzusetzen. Durch Zusatz von katalytischen Mengen Cystein, die selber keine kostimulierende Wirkung besitzen, sollte der Überschuß an NO, entsprechend der Nitrosothioltheorie (39), als Nitrosocystein gebunden, das Enzym dadurch aktiviert werden und das wieder freigesetzte, denitrosierte Cystein erneut in den Kreislauf einfließen. Die Konzentration von Cystein war 0,05 bzw. 0,1 mM, die von GTN bei allen Versuchen 0,05 mM. Die Kurven in D 15 und D 16 zeigen, daß diese Mengen unter dem Schwellenwert liegen, bei dem eine GC-Stimulation mit 0,05 mM GTN beginnt.

Tab. 20: GC-Aktivierung durch GTN in Gegenwart von GSH und katalytischen Mengen von Cystein.

GC-Aktivität in pMol cGMP/min/mg Protein				
Basal	0,05 mM GTN 0,05 mM Cys	0,05 mM GTN 0,1 mM Cys	0,05 mM GTN 0,05 mM Cys 5 mM GSH	0,05 mM GTN 0,1 mM Cys 5 mM GSH
5,53 ± 0,20	7,47 ± 0,24	8,27 ± 0,54	5,04 ± 0,16	8,62 ± 0,49

Tab. 20 zeigt, daß eine katalytische Wirkung von Cystein in Gegenwart eines potentiellen NO-Lieferanten nicht auftritt.

D 19 GC-Aktivität bei gleichzeitiger Gegenwart von Cystein und Homocystein

Tab. 21: GC-Aktivierung durch GTN bei gleichzeitiger Gegenwart von Cystein und Homocystein.

GC-Aktivität in pMol cGMP/min/mg Protein			
Basal	0,05 mM GTN 5 mM Cys	0,05 mM GTN 5 mM Homoc	0,05 mM GTN 5 mM Cys 5 mM Homoc
5,53 ± 0,20	250 ± 10,1	6,91 ± 0,16	173,6 ± 3,91

Setzt man einem Reaktionsansatz, der 5 mM Cystein und 0,05 mM GTN enthält, 5 mM Homocystein zu, so wird die GC-Stimulierung um 31% vermindert (Tab. 21). Homocystein alleine ist zwar in der Lage, GTN abzubauen, stimuliert die GC aber nicht. Es ist denkbar, daß in der Lösung beide Thiole um das GTN konkurrieren, aber nur das aus der Reaktion zwischen GTN und Cystein entstehende Produkt, wie z.B. das Nitrosocystein, die GC zu stimulieren vermag. Der durch Homocystein reduktiv denitrierte Anteil des Nitrats stünde so für eine Stimulierung nicht mehr zur Verfügung. Neben der umstrittenen Nitrosothioltheorie ließe sich der Effekt auch über eine direkte Hemmung der GC-Stimulierung durch Homocystein erklären.

D 20 Abbau verschiedener organischer Nitrate in Gegenwart von Cystein

Die Untersuchungen an der GC ergeben für die Wirkstärke der getesteten Nitrate, ausgedrückt als EC_{50}, eine bestimmte Reihenfolge. Bei allen gezeigten Konzentrations-Wirkungsbeziehungen ist die Aminosäure Cystein der entscheidende Faktor, der eine Aktivierung des Enzyms unter Induzierung noch nicht völlig geklärter chemischer Reaktionen ermöglicht. Einer dieser thiolabhängigen Zwischenschritte ist der Abbau des betreffenden organischen Nitrats, wobei durch eine reduktive Denitrierung Nitrit abgespalten wird, das im weiteren Verlauf der Reaktion über salpetrige Säure NO freisetzt. Anhand einer repräsentativen Auswahl von 6 Verbindungen, die sich in Anzahl und sterischer Anordnung der Nitratgruppen unterschieden, sollte der Nitratabbau unter Einfluß von 5 mM Cystein gemessen werden.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 22 dargestellt.

Tab. 22: Abbau verschiedener organischer Nitrate in Gegenwart von 5 mM Cystein.

Org. Nitrat	Konzentration (mM)	Inkubationsdauer (h)	Wiederfindung (%)
GTN	0,05	1	75,4
IMDN	0,25	12	37,2
IIDN	0,25	12	46,7
ISDN	0,25	12	52,6
IS-2-N	1	12	77,4
IS-5-N	1	12	81,5

Der Abbau der Nitrate wurde im Konzentrationsbereich der am Enzym ermittelten EC_{50} gemessen. Im Inkubationsvolumen befanden sich neben 50 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,5) nur das Nitrat und 5 mM Cystein.

D 21 Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten

Wie in D 14 für GTN beschrieben, läßt sich aus der prozentualen Wiederfindung die Geschwindigkeitskonstante k des Abbaus und die Halbwertszeit $t_{1/2}$ für jedes untersuchte Nitrat berechnen:

$$c = c_o \cdot e^{-kt}$$

$$k = \frac{1}{t} \cdot \ln \frac{c_o}{c}$$

Für ISDN z.B. erhält man durch Einsetzen der zum Zeitpunkt t = 12 h gemessenen Konzentration von 52,6%:

$$k = \frac{1}{12} \cdot \ln \frac{1}{0{,}526} \quad (h^{-1})$$

$$k = 0{,}0535 \quad (h^{-1})$$

Für die Halbwertszeit gilt:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

Im Falle von ISDN erhält man:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{0{,}0535} \quad (h)$$

$$t_{1/2} = 12{,}96 \quad (h)$$

Tab. 23 zeigt die Geschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten der untersuchten Nitrate im Überblick.

Tab. 23: Geschwindigkeitskonstanten k und Halbwertszeiten $t_{1/2}$ des Abbaus von 6 organischen Nitraten in Gegenwart von 5 mM Cystein.

Organ. Nitrat	k (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)
GTN	0,2820	2,46
IMDN	0,0842	8,41
IIDN	0,0634	10,93
ISDN	0,0535	12,96
IS-2-N	0,0213	32,54
IS-5-N	0,0170	40,77

D 22 Berechnung der freigesetzten NO-Menge aus dem Nitratabbau

Die Proben für die Bestimmung der GC-Aktivierung durch organische Nitrate wurden 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Um eine vergleichende Betrachtung von Nitratabbau und GC-Stimulation anstellen zu können, muß die Menge an NO berechnet werden, die innerhalb von 15 Minuten freigesetzt wird. Dabei ist zu berücksichtigen, daß beim GTN und den Dinitraten die entstehenden Metabolite ebenfalls abgebaut werden und als zusätzliche NO-Lieferanten in Frage kommen. Für das ISDN konnte mit einem Iterationsverfahren berechnet werden, daß die nach 12 h zusätzlich aus den Mononitraten abgespaltene NO-Menge 1,5% der gesamten NO-Konzentration ausmacht. Diese Menge ist vernachlässigbar klein. Die Konzentration an Mononitraten steigt erst mit dem zunehmenden Zerfall des ISDN an, ist in den ersten 15 Minuten also auch im Verhältnis geringer als nach 12 h.
Die aus den Mononitraten freigesetzte NO-Menge ergibt, gegen die Zeit aufgetragen, einen sigmoiden Verlauf,

so daß der relative Anteil an der in den ersten 15 Minuten insgesamt entstandenen Stickoxidmenge weit geringer ist als nach 12 h. Für GTN und seine Metabolite finden sich die gleichen Verhältnisse, d.h. für die Berechnung der wirksamen NO-Menge im GC-Test kann man davon ausgehen, daß pro Molekül organisches Nitrat, auch wenn diese mehrere Nitratgruppen besitzen, ein Molekül NO freigesetzt wird.
Damit ist die entstehende molare Menge an NO identisch mit der molaren Menge an abgebautem organischen Nitrat; d.h. für die Berechnung läßt sich die Exponentialfunktion aus D 14 verwenden:

$$c = c_o \cdot e^{-kt}$$

Es wurde bei den Nitraten die bei einer äquieffektiven Konzentration (EC_{50}) nach 15 Minuten freigesetzte NO-Menge verglichen. Für das IMDN ergibt sich:

$k = 0{,}0824 \quad (h^{-1})$
$c_o = 0{,}20 \quad (mM)$
$t = 0{,}25 \quad (h)$

$c = 0{,}20 \cdot e^{-0{,}0824\ 0{,}25} \quad (mM)$
$c = 0{,}19592 \quad (mM)$

Nach 15 Minuten Inkubation beträgt die Wiederfindung also noch 0,19592 mM. Die in dieser Zeit freigesetzte NO-Konzentration berechnet sich aus:

$$[NO]_{t=15'} = c_o - c$$

$[NO]_{t=15'} = 0{,}20 - 0{,}19592 \quad (mM)$
$= 0{,}00408 \quad (mM)$
$= 4{,}08 \quad (\mu M)$

D 23 Korrelation zwischen cysteininduzierter NO-Freisetzung und GC-Aktivierung

Die für die untersuchten organischen Nitrate berechneten NO-Mengen sind in Tabelle 24 wiedergegeben.

Tab. 24: Bei äquieffektiver Aktivierung des Enzyms (EC_{50}) ist die durch die Reaktion mit Cystein freigesetzte NO-Menge konstant. Proben, die ohne Cystein inkubiert wurden, dienten als Kontrollen. Ihre Geschwindigkeitskonstanten betrugen weniger als 1% der Tabellenwerte und waren vernachlässigbar.

Organ. Nitrat	EC_{50} (mM)	k (h^{-1})	k EC_{50} (mM h^{-1})	$[NO]_{t=15'}$ (µM)
GTN	0,06	0,2820	0,0169	4,09
IMDN	0,20	0,0824	0,0165	4,08
IIDN	0,24	0,0634	0,0152	3,78
ISDN	0,28	0,0535	0,0150	3,72
IS-2-N	0,75	0,0213	0,0160	3,98
IS-5-N	1,00	0,0170	0,0170	4,24

Es zeigt sich, daß bei äquieffektiver Aktivierung des Enzyms (EC_{50}) die freigesetzte NO-Konzentration konstant ist. Dabei stehen EC_{50} und die Geschwindigkeitskonstante k des Nitratabbaus in einem umgekehrt proportionalen Verhältnis zueinander, d.h. das Produkt aus k und EC_{50} ist konstant. Die Höhe der Enzymaktivierung ist also im Falle des Cysteins streng mit der thiolinduzierten NO-Freisetzung korreliert.

Abb. 33 zeigt die lineare Beziehung zwischen 1/k und EC_{50}, für die sich eine sehr gute Korrelation ergibt. Dies erklärt auch die Ähnlichkeit zwischen Abbaukinetik und GC-Aktivierung bei GTN, die in D 15 und D 16 beschrieben wurde.

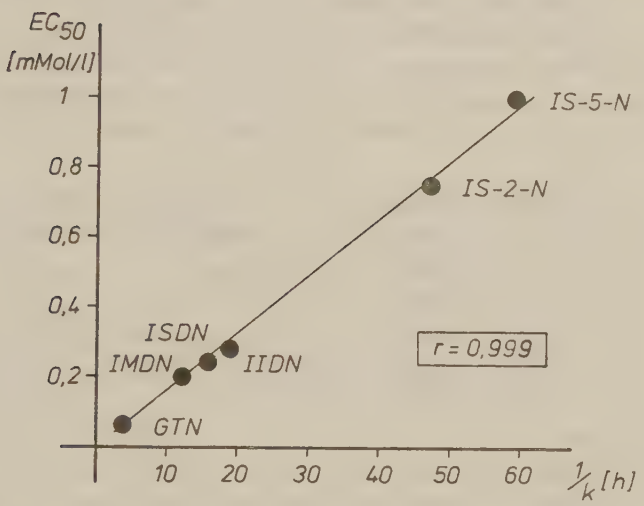


Abb. 33: Beziehung zwischen cysteinabhängigem Nitratabbau (1/k) und enzymatischer Wirksamkeit (EC_{50}).

D 24 Abbau verschiedener organischer Nitrate in Gegenwart von Cystein und GC-Fraktion

GTN wird im GC-Test sowohl enzymatisch durch die Glutathion-S-transferase (E.C. 2.5.1.18) als auch spontan durch eine chemische Reaktion mit Thiolen abgebaut. Wir haben es also hier mit 2 gleichzeitig ablaufenden, aber voneinander unabhängigen Abbauvorgängen zu tun. Es war von Interesse, die Abbauraten der unter D 20 beschriebenen Verbindungen zu ermitteln. Die Inkubationslösung entsprach in ihrer Zusammensetzung dem GC-Test. Die Ergebnisse sind in Tab. 25 zusammen mit den Werten des rein thiolabhängigen Abbaus dargestellt.

Tab. 25: Nitratabbau durch Cystein in Abwesenheit (-Enzym) und in Gegenwart (+ Enzym) von hepatischer GC-fraktion.

Organ. Nitrat	Konzentration (mM)	Inkubationsdauer (h)	Wiederfindung (%) - Enzym	Wiederfindung (%) + Enzym
GTN	0,05	1	75,4	62,1
IMDN	0,25	12	37,2	47,0
IIDN	0,25	12	46,7	55,1
ISDN	0,25	12	52,6	65,3
IS-2-N	1,00	12	77,4	84,9
IS-5-N	1,00	12	81,5	87,9

Es ist auffällig, daß die Anwesenheit von hepatischer GC-Fraktion nur im Falle des GTN zu einer Verstärkung des Abbaus führt. Bei allen anderen untersuchten Substanzen führt der Zusatz von Enzym zu einer höheren Wiederfindung, d.h. der rein cysteinabhängige Abbau der Nitrate wird gehemmt. Die hepatische GC-Fraktion übt offensichtlich eine Art Schutzeffekt bei der Denitrierung der cyclischen Nitrate aus. Im Gegensatz dazu wird GTN als offenkettiges Nitrat von Enzymen der hepatischen GC-Fraktion (Glutathion-S-transferase, E.C.

2.5.1.18) reduktiv denitriert, wobei sich der cysteinabhängige Abbau und die enzymatisch katalysierte Metabolisierung in ihrer Wirkstärke addieren.

Tab. 26: Geschwindigkeitskonstanten des Nitratabbaus durch Cystein in Abwesenheit (- Enzym) und in Gegenwart (+ Enzym) von hepatischer GC-Fraktion und daraus berechnete, freigesetzte NO-Menge.

Organ. Nitrat	k (h^{-1})		1/k (h)		$[NO]_{t=15'}$ (µM)	
	-Enzym	+Enzym	-Enzym	+Enzym	-Enzym	+Enzym
GTN	0,2820	0,4760	3,54	2,10	4,09	6,73
IMDN	0,0824	0,0629	12,14	15,90	4,08	3,12
IIDN	0,0634	0,0497	15,77	20,12	3,78	2,84
ISDN	0,0535	0,0355	18,69	28,17	3,72	2,47
IS-2-N	0,0213	0,0136	46,95	73,53	3,98	2,55
IS-5-N	0,0170	0,0107	58,82	93,46	4,24	2,67

Die Geschwindigkeitskonstanten k und die daraus resultierende NO-Freisetzung wurden nach den in D 21 und D 22 abgeleiteten Formeln berechnet und sind in Tabelle 26 den Werten des rein cysteininduzierten Nitratabbaus gegenübergestellt.

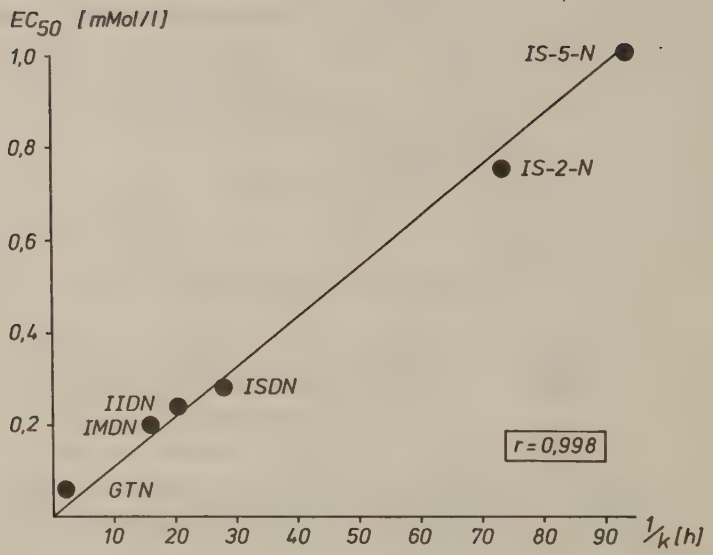


Abb. 34: Beziehung zwischen cysteinabhängigem Nitratabbau in Gegenwart von hepatischer GC-Fraktion (1/k) und enzymatischer Wirksamkeit (EC_{50}).

Abbildung 34 zeigt die Beziehung zwischen 1/k und der EC_{50} für den Nitratabbau in Gegenwart von Cystein und GC-Fraktion, d.h. unter den Bedingungen des GC-Tests. Im Vergleich zur Abb. 33 ist die Korrelation weniger gut. Dadurch, daß der Zusatz von Enzym den Abbau von GTN beschleunigt, den der übrigen Verbindungen aber verlangsamt, wird nur die Geschwindigkeitskonstante k für GTN erhöht, die der anderen Nitrate nimmt kleinere Werte an. Dies erklärt die Sonderstellung des GTN, das aus der Substanzreihe herausfällt und in Abb. 34 links von der Korrelationsgeraden steht. Außerdem ergibt die Be-

rechnung der freigesetzten NO-Menge im Falle des GTN einen Wert (6,73 µM), der um mehr als das Doppelte über denen der übrigen Nitrate liegt.

Für die GC-Aktivierung durch organische Nitrate und Cystein läßt sich daraus schließen, daß der durch den nichtenzymatischen Nitratabbau entstehende Anteil an NO von besonderer Bedeutung ist. Andere NO-freisetzende Abbauvorgänge, wie sie im komplexen Substanz- und Proteingemisch des GC-Tests ablaufen können, führen zu keiner direkten Beeinflussung der GC-Aktivität.

E DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß die pharmakologische Wirkung der organischen Nitrate auf subzellulärer Ebene in hohem Maße strukturabhängig ist. Die Untersuchungen wurden an gereinigten Proteinfraktionen durchgeführt, die aus Rattenleber und aus Schweinecarotiden gewonnen wurden.
Das darin enthaltene Enzym Guanylatcyclase (GC) (E.C. 4.6.1.2) gilt als Wirkort der organischen Nitrate auf molekularer Ebene (5) und vermittelt über das von ihm produzierte cGMP die hämodynamische Wirkung, die sich in einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur, insbesondere bei den venösen Kapazitätsgefäßen, widerspiegelt.
Die GC läßt sich neben Verbindungen, die eine NO-Funktion tragen, auch durch andere Substanzen in ihrer Aktivität beeinflussen.
Allen bisher bekannten Verbindungen ist die Eigenschaft gemeinsam, an Redoxprozessen teilnehmen zu können.
In der vorliegenden Arbeit wurde außer den organischen Nitraten und Nitroprussidnatrium (NPN), die beide zur Gruppe der potentiellen NO-Lieferanten gehören, in Vorversuchen Natriumazid eingesetzt. Dabei lassen die unterschiedlichen Bedingungen, die für eine Stimulation durch organische Nitrate oder durch Natriumazid erforderlich waren, Rückschlüsse auf den molekularen Mechanismus der GC-Aktivierung zu:
Während eine GC-Aktivierung durch organische Nitrate die Anwesenheit von Thiolen (2-Mercaptoethanol, Dithiothreitol) im Enzympuffer erforderlich machte, war eine Stimulierung mit Natriumazid auch ohne diesen Zusatz möglich.
Die Aktivierung durch Natriumazid ist also nicht von einem reduzierenden Reaktionsmilieu abhängig, sondern findet auch dann noch statt, wenn eine Präparation des Enzyms ohne schützende Antioxidantien erfolgt. Dies steht in guter Übereinstimmung mit Arbeiten von Craven et al. (14) und Murad et al. (67), die auch die GC-stimulierende Wirksamkeit von Natriumazid auf die Bildung von NO zurückführen. Diese Reaktion läuft in einem oxidierenden Reaktionsmilieu ab und würde durch den Zusatz von stark reduzierenden Substanzen eher

behindert. Nach den oben genannten Autoren ist die Aktivierung durch Natriumazid von der Anwesenheit eines Kofaktors abhängig, der u.a. aus Rattenleber isoliert wurde, Proteincharakter besitzt und als Katalase identifiziert wurde.
Katalase bewirkt die chemische Zersetzung von H_2O_2 nach folgender Gleichung:

$$2\,H_2O_2 \longrightarrow 2\,H_2O + O_2$$

und kann so die äußeren Bedingungen für eine Oxidation von Natriumazid zu NO schaffen. Der im Verlauf dieser Reaktion entstehende NO-Katalase-Komplex konnte durch Craven et al. (14) nachgewiesen werden. Eine GC-Aktivierung mit Natriumazid kann auch durch Peroxidase vermittelt werden (67), wobei eine direkte Oxidation des Substrates mit H_2O_2 nach folgendem Reaktionstyp stattfindet:

$$R\text{–}H_2 + H_2O_2 \longrightarrow R + 2\,H_2O$$

Hieraus läßt sich erklären, daß im Gegensatz zu den getesteten organischen Nitraten eine GC-Aktivierung durch Natriumazid auch und gerade in Abwesenheit von reduzierenden Substanzen beobachtet werden konnte.
Ein weiteres Indiz für die Regulation der GC-Aktivität über Redoxvorgänge ist der beobachtete inhibierende Effekt von Cystein (D 2). Dieser trat immer dann auf, wenn das Enzym ohne Zusatz von Thiolen bei -80°C gelagert worden war. Offensichtlich setzen auch bei dieser Temperatur Alterungsprozesse ein, die Konsequenzen für die katalytische Wirksamkeit des Enzyms nach sich ziehen. Da Präparation und Lagerung nicht unter Luft- bzw. Sauerstoffausschluß erfolgten, liegt der Verdacht nahe, daß es sich um oxidative Veränderungen des GC-Proteins handelt, zumal der Hemmeffekt von Cystein bei Zusatz von reduzierenden Substanzen zum Enzympuffer ausblieb. Obwohl ein derartiges Verhalten der GC in der Literatur noch nicht beschrieben wurde, sind ähnliche Reaktionen bei Zusatz von Disulfiden zum GC-Test bekannt (7, 91). Hierbei entstehen durch Reaktion mit sog. kritischen SH-Gruppen am Enzym

gemischte Disulfide, wodurch die basale und die stimulierte Aktivität des Enzyms verringert werden. Denkbar ist, daß aufgrund des bei der Lagerung herrschenden oxidierenden Milieus SH-Gruppen am Enzym zu Disulfiden reagieren, die wiederum mit dem zugesetzten Cystein, zumindest teilweise, gemischte Disulfide bilden. Dies könnte den paradoxen Hemmeffekt des Cysteins erklären.

Die Basalaktivität der GC steigt mit zunehmender Proteinkonzentration linear an, während bei einer Stimulation durch organische Nitrate eine umso größere Aktivierbarkeit beoachtet wird, je geringer die im GC-Test enthaltene Proteinmenge ist. Eine ähnliche Steigerung der Empfindlichkeit durch Verringerung der Enzymkonzentration wird von Kimura et al. im Falle des Natriumazids berichtet (45).

Dieses Phänomen ist durch verschiedene enzymkinetische Aspekte erklärbar:

1.) Eine geringer konzentrierte Proteinlösung führt durch eine freiere Entfaltung der Enzymstruktur zu einer gesteigerten Verfügbarkeit katalytisch wirksamer Zentren.
2.) Durch die relative Erhöhung der Nitratkonzentration pro Enzymmolekül wird die Zahl der pro Zeiteinheit stattfindenden Reaktionen zwischen Aktivator und Enzym vermehrt. Der auf das Enzym stimulierend wirkende Überschuß an NO bewirkt eine maximale Umsetzung des Substrates GTP.
3.) Eine größere Verdünnung der GC-Fraktion vermindert den Einfluß inhibierender Faktoren.

Zu den unter 3.) angesprochenen inhibierenden Faktoren zählen Calciumionen, die eine Aktivierung der GC durch NO-haltige Verbindungen schon im nanomolaren Bereich signifikant reduzieren (89). Der Zusatz des calciumbindenden Komplexbildners EGTA bewirkte insbesondere bei den Untersuchungen an Carotiden-GC eine Erhöhung der Aktivierbarkeit durch organische Nitrate. Die Stimulierung nahm unter Einfluß von EGTA linear mit der Proteinkonzentration zu, wobei ein Eigenef-

fekt des EGTA auf die Basalaktivität ausgeschlossen werden konnte. Dies steht in guter Übereinstimmung mit Untersuchungen von Frey et al., die eine direkte Stimulierung der GC durch Komplexbildner nur an chromatographisch hochgereinigten Enzymfraktionen nachweisen konnten (19). Diese Ergebnisse deuten auf Punkt 3.) als den entscheidenden Faktor für die Abhängigkeit der GC-Aktivität von unterschiedlichen Proteinkonzentrationen.

Die unter C 1.1.3.3 beschriebene Dialyse der GC-Präparation hatte zur Folge, daß die GC durch organische Nitrate auch ohne Zusatz von Cystein stimuliert werden konnte. Zwar waren die Aktivitäten vergleichsweise gering, doch die Reihenfolge der Stimulationsstärken bei den getesteten Substanzen war die gleiche wie unter Einfluß von Cystein. Dies spricht dafür, daß nach Abtrennung inhibierender Calciumionen eine Stimulation durch endogene Thiole der Leberfraktion stattfinden konnte, die vor diesem Reinigungsschritt nicht meßbar war.

Durch diese Voruntersuchungen, die sich neben der erwähnten Proteinabhängigkeit auch mit dem Einfluß von GTP-regenerierenden Systemen und PDE-Hemmern beschäftigten, konnte ein für die Erstellung von reproduzierbaren Konzentrations-Wirkungskurven ausreichend empfindlicher GC-Test konzipiert werden, bei dem die Zahl der potentiell störenden Fremdsubstanzen auf ein Minimum reduziert war. Dabei erwies sich Mg^{2+} im Vergleich zu Mn^{2+} als der günstigere Kofaktor. Die Basalaktivität lag in niedrigeren Bereichen und die Aktivierbarkeit war um ein Vielfaches höher als in Gegenwart von Mn^{2+}. Dies wird durch Arbeiten von McNamara et al. (58) bestätigt.

Außerdem gilt Mg^{2+} als das physiologisch relevante Kation bei der Regulation der GC-Aktivität.

Die in dieser Arbeit aufgestellten Struktur-Wirkungsbeziehungen beschreiben erstmalig die entscheidende Bedeutung der Nitratgruppenanzahl für die Wirkungsvermittlung der organischen Nitrate auf molekularer Ebene. Diese Abhängigkeit konnte gleichermaßen für die aus Rattenleber und aus Carotisgewebe gewonnene GC nachgewiesen werden, wobei die EC_{50} bei jeder zusätzlichen Nitratgruppe jeweils um den Faktor 4 abnahm. Mittels linearer Regression konnte für beide Systeme die Abhängigkeit der GC-Wirkung von der Nitratgruppenanzahl mathematisch exakt beschrieben werden:

Bei der Auftragung von ln (EC_{50}) gegen die Nitratgruppenanzahl lautete die Geradengleichung wie folgt:

$$\ln (Ec_{50}) = a + bn$$

n = Anzahl der Nitratgruppen je Molekül
a = Schnittpunkt der Ordinate für n = o
b = Steigung der Geraden

Für die Wirksamkeit an der Carotis-GC ergab sich:

$$\ln (EC_{50}) = 1{,}7996 - 1{,}3990\ n$$

$$EC_{50} = \frac{\exp (1{,}7996)}{\exp (1{,}3990)^n}$$

$$= \frac{6{,}047}{4{,}051^n}$$

$$= \frac{6}{4^n}$$

$$= 2^{-2n} \cdot 6$$

Mit den für beide Systeme ermittelten Formeln lassen sich die theoretischen EC_{50}-Werte berechnen, die in Tabelle 27 den an der GC gemessenen Werten gegenübergestellt sind. Dabei wurde die EC_{50} von ETN, GTN, ISDN und IS-5-N zugrunde gelegt.

Tab. 27: Korrelation zwischen den berechneten und gemessenen EC_{50}-Werten bei der GC an Rattenleber und Schweinecarotiden.

	Hepatische GC		Carotis-GC	
n*	$EC_{50}=2^{-2n}\cdot 4$ (mM)	EC_{50} gemessen (mM)	$EC_{50}=2^{-2n}\cdot 6$ (mM)	EC_{50} gemessen (mM)
1	1,0000	1,00	1,500	1,51
2	0,2500	0,24	0,380	0,36
3	0,0625	0,06	0,094	0,092
4	0,0156	0,014	-	-
	r = 0,99996		r = 0,99989	

*n = Anzahl der Nitratgruppen pro Molekül

Die sehr gute Korrelation macht den engen Zusammenhang zwischen der Anzahl der pharmakophoren Nitratgruppen und der biochemischen Wirksamkeit der Verbindungen deutlich.

Der bereits in D 12 angestellte Vergleich des Wirkprofils der organischen Nitrate am Langendorff-Herzen und an der GC läßt deutlich werden, daß Lipopholie und sterische Faktoren am intakten Organ die entscheidenden Parameter für die funktionelle Wirkung sind, da durch sie Transport- und Verteilungsvorgänge entscheidend beeinflußt werden. Diese pharmakokinetischen Aspekte sind bei der Untersuchung am isolierten Enzym ohne Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, daß eine Erhöhung der Lipophilie durch Veresterung mit Fettsäuren keinen nennenswerten Einfluß auf die GC-Aktivität besitzt. Die sterische Position der Nitratgruppe spielt bei der GC-Aktivierung eine untergeordnete Rolle. Bei den cyclischen Mononitraten sind die Verbindungen mit exo-ständiger Nitratgruppe wirksamer. Dies betrifft das Langendorff-Herz und die GC gleichermaßen. Der unter Cysteineinfluß gemessene Abbau der Mononitrate weist die Verbindung mit exo-ständiger Nitratgruppe (IS-2-N) ebenfalls als den im Vergleich zum IS-5-N stärkeren NO-Lieferanten aus, wobei EC_{50} und die berechnete NO-Freisetzung streng korrelieren. Bei den Mononitraten sind die quantitativen Struktur-Wirkungsbeziehungen also in allen 3 Systemen zumindest in der Reihenfolge ihrer Wirkstärke dieselben. Bei den cyclischen Dinitraten ist dies nicht mehr der Fall:

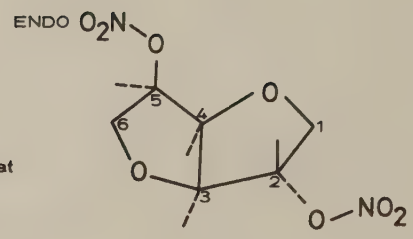
Für die Reihenfolge der Wirksamkeit in den verschiedenen Systemen gilt:

Langendorff-Herz (72) : IIDN > ISDN > IMDN
Guanylatcyclase : IMDN > IIDN > ISDN
Nitratabbau : IMDN > IIDN > ISDN

Für die Systeme GC und Nitratabbau konnte eine enge Korrelation festgestellt werden, die auf den ursächlichen Zusammenhang zwischen NO-Freisetzung und GC-Aktivierung hindeutet.

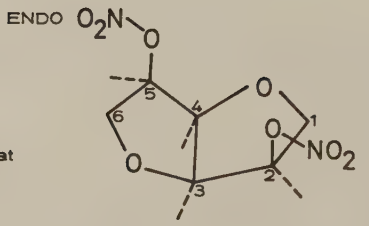
Beim Langendorff-Herzen sind es, wie schon erwähnt, Transport- und Permeationsvorgänge, die die Bioverfügbarkeit und damit das Ausmaß der pharmakodynamischen Wirkung entscheidend beeinflussen. Vor diesem Hintergrund verliert die Fähigkeit zur GC-Aktivierung an Bedeutung, und das Anfluten der Substanz am Wirkort wird zum bestimmenden Schritt der hämodynamischen Wirksamkeit:

Es ist denkbar, daß die umgekehrte Reihenfolge beim Langendorff-Herzen Ausdruck der unterschiedlichen Fähigkeit der Dinitrate ist, durch Membranen hindurchzupermeieren. Die lösliche GC, die die Nitratwirkung vermittelt, befindet sich, wie eingangs ausführlich beschrieben, im Intrazellulärraum. Da die Lipophilie der Verbindungen annähernd gleich ist, können es nur die sterischen Faktoren sein, die hier eine Rolle spielen (s. Abb. 35).



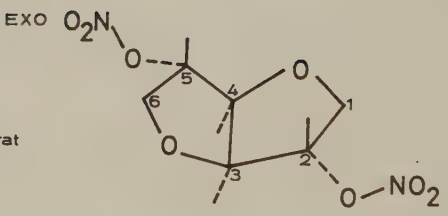
ISDN

Isosorbiddinitrat



IMDN

Isomanniddinitrat



IIDN

Isoididdinitrat

Abb. 35

Danach ist die endo-Position für eine sterische Hinderung des Membrantransports verantwortlich. Dies wäre erklärlich durch die axiale Stellung, die die endo-Nitratgruppe einnimmt, wodurch sie aus der Ebene des Ringsystems herausragt und dem Molekül ein "sperriges" Aussehen gibt. Die exo-Nitratgruppe dagegen besitzt eine äquatoriale Stellung und befindet sich in der gleichen Ebene wie das Ringsystem. Beim Durchtritt durch Membranen wäre das IIDN mit 2 exo-ständigen Nitratgruppen und seiner geringeren Ausdehnung eindeutig begünstigt, während das IMDN die geringste Permeationsgeschwindigkeit aufwiese.

Dies würde die unterschiedliche Wirksamkeit der cyclischen Dinitrate in vivo (Langendorff-Herz) und in vitro (GC) erklären.

Für die Bedeutung von Cystein bei der GTN-Wirkung auch in vivo spricht eine Untersuchung von Laustiola et al. (53). In dieser Arbeit wird eine Abhängigkeit der durch GTN induzierten cGMP-Produktion von Cystein auch im intakten Zellverband (schlagender Rattenvorhof) festgestellt, wobei die eingesetzten Konzentrationen (2,5 mM - 5 mM Cystein) die gleichen sind wie in der vorliegenden Arbeit.

Auch bei der Entstehung der Nitrattoleranz scheinen die Thiole eine Rolle zu spielen. Kukovetz und Mitarbeiter (48) konnten am aufgespannten Koronarstreifen durch Zusatz von Cystein die ursprüngliche Empfindlichkeit des Gefäßes für Nitroglycerin zumindest teilweise wiederherstellen, was auf eine Erschöpfung des Cysteinpools als mögliche Ursache für das Toleranzphänomen hindeutet. Eine Erklärung für die in der zitierten Arbeit verwandten sehr hohen Cysteinkonzentrationen bis zu 10 mM könnte sein, daß Cystein als Aminosäure über einen aktiven Transportmechanismus in die Zelle gelangt, der nur eine begrenzte Kapazität besitzt.
Es ist denkbar, daß das lipophilere N-Acetyl-L-cystein dessen Wirkung als Kostimulans in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschrieben wird, aufgrund seiner besseren Membrangän-

gigkeit bereits in wesentlich geringeren Konzentrationen die Nitrattoleranz aufhebt.

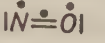
Die für die GC-Wirksamkeit und den Nitratabbau ermittelte sehr gute Korrelation spricht, zumindest im Falle des Cysteins, dafür, daß die thiolabhängige NO-Freisetzung das Ausmaß der GC-Aktivierung direkt bestimmt. Um weiteren Aufschluß hierüber zu erhalten, wurde der Nitratabbau unter Einfluß verschiedener Thiole gemessen, wobei sich folgender überraschender Befund ergab:
Der Nitratabbau korrelierte keineswegs in jedem Fall mit der gemessenen Enzymaktivität, so daß zwischen der NO-Freisetzung einerseits und der GC-Aktivierung andererseits weitere biochemische Zwischenschritte in Betracht gezogen werden müssen. Bei allen folgenden Überlegungen zum Einfluß von Thiolen auf die Freisetzung von NO als GC-stimulierendem Agens muß berücksichtigt werden, daß die NO-Konzentration nicht direkt gemessen, sondern nur aus der Abbaurate des jeweiligen Nitrats berechnet wurde. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Gegenwart der unterschiedlichen SH-Gruppen tragenden Substanzen auch eine Weiterreaktion des Nitrits bzw. des Stickoxids zu anderen Verbindungen zur Folge hat, die die GC nicht mehr aktivieren. Die reduktive Denitrierung eines organischen Nitrats durch ein Thiol wie Cystein wird durch folgende Redoxgleichung beschrieben:

$$R{-}CH_2{-}O{-}\overset{+5}{N}O_2 + 2\,R{-}\overset{-1}{S}H \longrightarrow R{-}CH_2OH + R{-}\overset{\pm 0}{S}{-}\overset{\pm 0}{S}{-}R + H\overset{+3}{O}NO$$

Salpetrige Säure setzt unter Protoneneinfluß Stickoxid als GC-stimulierendes Agens frei:

$$HONO \xrightarrow{[H^+]} NO$$

Dieses giftige paramagnetische Gas gehört zu den wenigen Hauptgruppenoxiden mit ungerader Elektronenzahl:



Der radikalische Charakter dieses Moleküls und die daraus resultierende Bereitschaft, an Redoxprozessen teilzunehmen, erklären seine Fähigkeit, die GC-Aktivität nachhaltig zu beeinflussen.

Braughler und Mitarbeiter sehen im NO-Molekül ein direktes Stimulans der GC (11) und konnten zeigen, daß ein Überschuß an NO einen hemmenden Effekt auf das Enzym hat, vermutlich aufgrund eines zu starken oxidativen Effekts. Dieses Phänomen tritt insbesondere dann auf, wenn die GC bis zur Homogenität gereinigt ist und die Enzymlösung keine natürlichen Antioxidantien mehr enthält wie Thiole, Zucker oder Hämoglobin, die einen Überschuß an NO abfangen und binden können.

Etwa seit 1981 weist eine ständig steigende Zahl von Publikationen dem Hämmolekül eine zentrale Bedeutung bei der GC-Aktivierung durch NO-haltige Verbindungen zu (13, 21, 23). Demgegenüber ist die Nitrosothioltheorie zunehmend in den Hintergrund getreten. Auch die neueren Arbeiten von Ignarro und Mitarbeitern beschäftigen sich mit der Möglichkeit einer GC-Stimulierung durch NO-Hämkomplexe (16, 35, 40) und andere Porphyrinabkömmlinge (33, 41, 42, 75). Dabei wird den instabilen Nitrosothiolen, sofern sie sich unter physiologischen Bedingungen überhaupt bilden, nur noch die Funktion eines weiteren NO-freisetzenden Zwischenproduktes bei der Bildung von NO-Hämkomplexen zugesprochen (42, 59). Auch bei der strukturgebundenen GC wird die Beteiligung von Porphyrinstrukturen an der Regulierung der Enzymaktivität diskutiert (95).

Nach den hier vorgelegten Ergebnissen kann bei der Bildung von NO-haltigen direkten Aktivatoren, wie NO-Hämkomplexen, allein die Menge des pro Zeiteinheit gebildeten NO nicht der entscheidende Faktor sein: Trotz Abbau des GTN waren z.B. GSH oder Cysteamin nicht in der Lage, die GC zu stimulieren. Andererseits wurde außer bei Cystein und Thiosalicylsäure auch bei N-Acetyl-L-cystein eine Stimulierung der GC beobachtet, obwohl diese Verbindung im Vergleich zu den beiden anderen GTN nur in geringem Maße abbaut. Die Wirkung von Thiosalicylsäure als Kostimulans konnte von Schmidt und Mitarbeitern in jüngster Zeit auch an der GC aus Koronararterien gezeigt werden (82).

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen also, daß eine kleine Abbaurate eine überproportionale GC-Aktivierung nach sich ziehen kann. Die im Überschuß eingesetzten, reduzierend wirkenden Thiole könnten aufgrund ihres variierenden Normalpotentials die Aktivierbarkeit der GC über das in der Lösung herrschende Redoxgleichgewicht direkt beeinflussen. Dies wäre neben der NO-Freisetzung eine zweite wichtige Thiolwirkung:
Durch unterschiedliche Einstellung von sog. Thiol-Disulfidquotienten kann der Redoxzustand einer Zelle und die Aktivität der in ihr befindlichen Enzyme verändert werden. Bei der Freisetzung von Insulin aus den Inselzellen des Pankreas wird eine solche Abhängigkeit vom GSH/GSSG-Quotienten diskutiert (1). Da eine Aktivierung der GC nur möglich ist, wenn das zentrale Eisenatom des Häms die Oxidationsstufe II aufweist (13, 27, 95), wäre es denkbar, daß nur bestimmte Thiole wegen ihres spezifischen reduzierenden Effekts in der Lage sind, eine Oxidation zum unwirksamen Hämin (Zentralatom: Fe III) zu verhindern.

Dies wird auch durch die zu Beginn beschriebene Empfindlichkeit der GC gegenüber Redoxvorgängen jeder Art unterstützt.

Als weiterer Faktor, der bei der Stimulierbarkeit durch GTN und Thiole eine modulierende Rolle spielen könnte, käme z.B. der pK_a-Wert des Thiols in Frage. Auffällig ist, daß die drei zur Aktivierung fähigen Thiole eine freie Carboxylgruppe tragen. Die Bildung von intermediären Verbindungen wie den S-Nitrosothiolen könnte durch dieses gemeinsame Strukturmerkmal begünstigt sein, zumal durch Protonen die Bildungsgeschwindigkeit erhöht und die Halbwertszeit verlängert wird (17, 80, 86, 93).

Auch die Tatsache, daß katalytische Mengen von Cystein in Gegenwart einer stark denitrierenden Substanz wie GSH keine GC-Stimulation zeigen, spricht dafür, daß die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Thiols selbst entscheidend sind, die erst bei hohen Konzentrationen zum Tragen kommen.

Nur im Falle des Cysteins läßt sich der rein thiolinduzierte Nitratabbau mit der GC-Aktivität korrelieren, so daß dieser ubiquitär vorkommenden Aminosäure eine Schlüsselfunktion bei der Nitratwirkung zukommt. Sie besitzt neben der NO-freisetzenden Potenz weitere, noch ungeklärte Eigenschaften, durch die sie das freigesetzte Agens NO seiner GC-Wirksamkeit zuführt.

Das auf enzymatischem Wege entstehende NO scheint für die Stimulation von untergeordneter Bedeutung zu sein:

1) Die Berechnung der im GC-Test freigesetzten Menge an NO ergibt bei äquieffektiven Konzentrationen der organischen Nitrate keine konstanten Werte.
2) GSH baut als Kosubstrat zusammen mit der in der GC-Fraktion enthaltenen Glutathion-S-transferase 80% des GTN ab. Dennoch wird auch nach Zusatz von katalytischen Mengen Cystein keine Stimulation beobachtet.

Die vorgelegten Ergebnisse unterstreichen die zentrale Bedeutung von Strukturen mit SH-Funktionen für die Nitratwirkung an der GC. Es ist anzunehmen, daß auch für die synthetische Weiterentwicklung antianginös wirksamer Substanzen vom Typ der organischen Nitrate die Thiolkomponente eine Rolle spielen wird (chemische Kopplung von Cysteinderivaten mit organischen Nitraten), da für die Wirkung auf klinischer (32) und molekularer Ebene die Abhängigkeit von SH-Gruppen als gesichert betrachtet werden kann.

F ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von Struktur-Wirkungsbeziehungen bei der Stimulation der Guanylatcyclase (GC) durch organische Nitrate.

Um eine ausreichende Empfindlichkeit zur Aufnahme reproduzierbarer Konzentrations-Wirkungskurven zu erreichen, wurde die aus Rattenleber bzw. Schweinecarotiden gewonnene GC verschiedenen Reinigungsprozessen unterworfen. Im Rahmen einer weiteren methodischen Optimierung wurde die Abhängigkeit der GC-Aktivität von folgenden Faktoren untersucht:

1.) Proteinkonzentration
2.) GTP-regenerierende Systeme
3.) PDE-Hemmer
4.) Kofaktor Mg^{2+}/Mn^{2+}

Für die Aufnahme von Konzentrations-Wirkungskurven erwies sich eine Proteinmenge von 30 µg je Probe als günstig, weil in diesem niedrigen Konzentrationsbereich die Empfindlichkeit der GC am größten war.

Eine überzeugende Aktivierung der GC durch organische Nitrate gelang nur in Gegenwart von Cystein (in geringerem Maße auch in Gegenwart von N-Acetyl-L-cystein und Thiosalicylsäure).
Die Stimulation der GC durch Natriumazid war thiolunabhängig und bedurfte keines reduzierenden Reaktionsmilieus. Dies erklärt sich aus der Tatsache, daß der GC-Wirkung über den gemeinsamen Metaboliten NO im Falle des Natriumazids eine Oxidation des Stickstoffs vorausgeht. Die Auswertung der Konzentrations-Wirkungskurven über die EC_{50} führte zu folgenden Ergebnissen:

1.) Die Wirkstärke der einzelnen Nitrate hängt in hohem Maße von der Anzahl der pharmakophoren Nitratgruppen je Molekül ab. Dabei wurde ein strenger mathematischer Zusammenhang zwischen der EC_{50} und der Nitratgruppenzahl n gefunden, der in beiden untersuchten Systemen (GC aus Carotiden und Rattenleber) Gültigkeit besaß:

$$EC_{50} = 2^{-2n} \cdot k \quad (mM)$$

Lediglich die dimensionslose Konstante k nahm unterschiedliche Werte an. Aus der Formel geht hervor, daß mit jeder weiteren Nitratgruppe die EC_{50} jeweils um den Faktor 4 abnimmt.

2.) Die sterische Position der Nitratgruppe bei den cyclischen Nitraten vom Typ des 1,4:3,6-Dianhydrohexits spielt eine untergeordnete Rolle. Bei den Mononitraten sind die Verbindungen mit exo-ständiger Nitratfunktion (z.B. IS-2-N) etwas wirksamer als die mit endo-ständiger Nitratgruppe (IS-5-N).

3.) Die Lipophilie spielt bei der GC-Wirksamkeit der Verbindungen keine Rolle. Eine Erhöhung der Fettlöslichkeit durch Veresterung der freien OH-Gruppen verändert die EC_{50} kaum, da bei der Wirkung am isolierten Enzym Permeations- und Verteilungsvorgänge keine Rolle spielen. Ein Vergleich mit dem Wirkprofil der betreffenden Verbindungen am Langendorff-Herzen zeigt, daß hier die Lipophilie der entscheidende Parameter ist. Im intakten Zellverband müssen die Substanzen erst diverse Membranbarrieren überwinden, bevor sie zu der im Cytosol gelösten GC gelangen.

Die organischen Nitrate stimulieren die GC über den gemeinsamen Metaboliten NO. Um Aufschluß über den Mechanismus der thiolabhängigen NO-Freisetzung zu erhalten, wurde der Nitratabbau mittels HPLC in Gegenwart unterschiedlicher SH-Gruppen tragender Verbindungen gemessen, die zum größten Teil als Derivate der Aminosäure Cystein aufgefaßt werden können.
Dies führte zu folgenden Ergebnissen:

1.) Im Falle des Cysteins wurde eine strenge Korrelation zwischen dem Nitratabbau bzw. der daraus errechneten NO-Freisetzung und der Wirkstärke an der GC gefunden. Bei äquieffektiven Dosen (EC_{50}) war die während der Inkubationsdauer aus dem jeweiligen Nitrat freigesetzte Menge an NO konstant.

2.) Bei den übrigen Thiolen konnte keine Beziehung zwischen Nitratabbau und GC-Aktivierung gefunden werden. Einer hohen Abbaurate stand in einigen Fällen nur eine geringfügig erhöhte Basalaktivität gegenüber (GSH); umgekehrt waren Verbindungen mit geringer Abbaurate in der Lage, die GC überproportional zu aktivieren (N-Acetyl-L-cystein). Auch der Zusatz von katalytischen Mengen Cystein zu einem Thiol mit hoher denitrierender Potenz (GSH) führte nicht zu einer entsprechenden Aktivierung der GC.

Für den molekularen Mechanismus der GC-Aktivierung durch organische Nitrate bedeuten diese Ergebnisse einen weiteren wichtigen Hinweis darauf, daß zwischen NO-Freisetzung einerseits und der Enzymstimulation andererseits zusätzliche, bisher ungeklärte biochemische Zwischenschritte eine essentielle Rolle spielen.

G LITERATUR

1) Ammon, H.P.T., Bumiller, G., Düppenbecker, H., Heinze E., Lutz, S., Verspohl, E.J.:
Pentose phosphate shunt, pyridine nucleotides, glutathione, and insulin secretion of fetal islets.
Am. J. Physiol. 244 (Endocrinol. Metab. 7), E354-E360 (1983)

2) Ashman, D.F., Lipton, R., Melicow, M.M., Price, T.D.:
Isolation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate form rat urine.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 11, 330-334 (1963)

3) Beckett, P.R.:
The isolated perfused heart preparation: Two suggested improvements.
J. Pharm. Pharmacol. 22, 818-822 (1970)

4) Bennett, B.M., Nakatsu, K., Brien, J.F., Marks, G.S.:
Biotransformation of glyceryl trinitrate to glyceryl dinitrate by human hemoglobin.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 62, 704-706 (1984)

5) Böhme, E., Graf, H., Schultz, G.:
Effects of sodium nitroprusside and other smooth muscle relaxants on cyclic GMP formation in smooth muscle and platelets.
Adv. Cyclic Nucleotide Res. 9, 131-143 (1978)

6) Böhme, E., Grossmann, G., Herz, J., Mülsch, A., Spies, C., Schultz, G.:
Regulation of cyclic GMP formation by soluble guanylate cyclase: Stimulation by NO-containing compounds.
Adv. Cycl. Nucl. Nucl. Prot. Phosphoryl. Res. 17, 259-266 (1984)

7) Brandwein, H.J., Lewicki, J.A., Murad, F.:
Reversible inactivation of guanylate cyclase by mixed disulfide formation.
J. Biol. Chem. 256, 2958-2962 (1981)

8) Brandwein, H.J., Lewicki, J.A., Waldman, S.A., Murad, F.:
Effect of GTP analogues on purified soluble guanylate cyclase.
J. Biol. Chem. 257, 1309-1311 (1982)

9) Braughler, J.M.:
Soluble guanylate cyclase activation by nitric oxide and its reversal-involvement of sulhydryl group oxidation and reduction.
Biochem. Pharmacol. 32, 811-818 (1983)

10) Braughler, J.M., Mittal, C.K., Murad, F.:
Purification of soluble guanylate cyclase from rat liver.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 219-222 (1979)

11) Braughler, J.M., Mittal, C.K., Murad, F.:
Effects of thiols, sugars, and proteins on nitric oxide activation of guanylate cyclase.
J. Biol. Chem. 254, 12450-12454 (1979)

12) Cooper, T.G.:
Biochemische Arbeitsmethoden S. 51, Walter de Gruyter, Berlin, New York (1981)

13) Craven, P.A., DeRubertis, F.R.:
Requirement for heme in the activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide.
Biochim. Biophys. Acta 745, 310-321 (1983)

14) Craven, P.A., DeRubertis, F.R., Pratt, D.W.:
Electron spin resonance study of the role of NO-catalase in the activation of guanylate cyclase by NaN_3 and NH_2 OH-modulation of enzyme responses by heme proteins and their nitrosyl derivatives.
J. Biol. Chem. 254, 8213-8222 (1979)

15) Dunham, E.W., Haddox, M.K., Goldberg, N.D.:
Alteration of vein cyclic 3',5'-nucleotide concentrations during changes in contractility.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 815-819 (1974)

16) Edwards, J.C., Barry, B.K., Gruetter, D.Y., Ohlstein, E.H., Baricos, W.H., Ignarro, L.J.:
Activation of hepatic guanylate cyclase by nitrosyl-heme complexes - comparison of unpurified and partially purified enzyme.
Biochem. Pharmacol. 30, 2531-2538 (1981)

17) Field, L., Dilts, R.V., Ravichandran, R., Lenhert, P.G., Carnahan, G.E.:
An unusually stable thionitrite from N-acetyl-D,L-penicillamine; X-ray crystal and molecular structure of 2-(acetylamino)-2-carboxy-1,1-dimethylethyl thionitrite.
J.C.S. chem. Comm. 249-250 (1978)

18) Fiscus, R.R., Rapoport, R.M., Murad, F.:
Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced activation of cyclic GMP-dependent protein kinase in rat aorta.
J. Cycl. Nucl. Prot. Phosphoryl. Res. 9, 415-425 (1983-84)

19) Frey, II, W.H., Senogles, S.E., Tuason, V.B., Nicol, S.E.:
Stimulation of guanylate cyclase by EDTA and other chelating agents.
Biochim. Biophys. Acta 658, 369-376 (1981)

20) Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V.:
The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.
Nature 288, 273-276 (1980)

21) Gerzer, R., Böhme, E., Hofmann, F., Schultz, G.:
Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper.
FEBS Lett. 132, 71-74 (1981)

22) Gerzer, R., Hofmann, F., Böhme, E., Ivanova, K., Spies, C., Schultz, G.:
Purification of soluble guanylate cyclase without loss of stimulation by sodium nitroprusside.
Adv. Cyclic Nucleotide Res. 14, 255-261 (1981)

23) Gerzer, R., Radany, E.W., Garbers, D.L.:
The separation of the heme and apoheme forms of soluble guanylate cyclase.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 108, 678-686 (1982)

24) Glass, D.B., Frey, II, W., Carr, D.W., Goldberg, N.D.:
Stimulation of human platelets guanylate cyclase by fatty acids.
J. Biol. Chem. 252, 1279-1285 (1977)

25) Goldberg, N.D., Haddox, M.K.:
Cyclic GMP metabolism and involvement in biological regulation.
Ann. Rev. Biochem. 46, 823-896 (1977)

26) Gruetter, C.A., Barry, B.K., McNamara, D.B., Gruetter, D.Y., Kadowitz, P.J., Ignarro, L.J.:
Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside, and a carcinogenic nitrosoamine.
J. Cyclic Nucleotide Res. 5, 211-224 (1979)

27) Gruetter, C.A., Kadowitz, P.J., Ignarro, L.J.:
Methylene blue inhibits coronary arterial relaxation and guanylate cyclase activation by nitroglycerin, sodium nitrite, and amyl nitrite.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 59, 150-156 (1981)

28) Gruetter, D.Y., Gruetter, C.A., Barry, B.K., Baricos, W.H., Hyman, A.L., Kadowitz, P.J., Ignarro, L.J.:
Activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside, and nitrosoguanidine - inhibition by calcium, lanthanum, and other cations, enhancement by thiols.
Biochem. Pharmacol. 29, 2943-2950 (1980)

29) Hardman, J.G., Sutherland, E.W.:
Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate.
J. Biol. Chem. 244, 6363-6370 (1969)

30) Harper, J.F., Brooker, G.:
Femtomole sensitive radioimmunoassay for cyclic AMP and cyclic GMP after 2'0 acetylation by acetic anhydride in aqueous solution.
J. Cyclic Nucleotide Res. 1, 207-218 (1975)

31) Heppel, L.A., Hilmoe, R.J.:
Metabolism of inorganic nitrite and nitrate esters II. The enzymatic reduction of nitroglycerin and erythritol tetranitrate by glutathione.
J. Biol. Chem. 183, 129-138 (1950)

32) Horowitz, J.D., Antman, E.M., Lorrell, B.H., Barry, W.H., Smith, T.W.:
Potentiation of the cardiovascular effects of nitroglycerin by N-acetylcysteine.
Circulation 68, 1247-1253 (1983)

33) Ignarro, L.J., Ballot, B., Wood, K.S.:
Regulation of soluble guanylate cyclase activity by porphyrins and metalloporphyrins.
J. Biol. Chem. 259, 6201-6207 (1984)

34) Ignarro, L.J., Barry, B.K., Gruetter, D.Y., Edwards, J.C., Ohlstein, E.H., Gruetter, C.A., Baricos, W.H.:
Guanylate cyclase activation by nitroprusside and nitroso guanidine is related to formation of S-nitrosothiol intermediates.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 94, 93-100 (1980)

35) Ignarro, L.J. Degnan, J.N., Baricos, W.H., Kadowitz, P.J., Wolin, M.S.:
Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme - comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung.
Biochim. Biophys. Acta 718, 49-59 (1982)

36) Ignarro, L.J., Gross, R.A., Gross, D.M.:
Inhibition of mammalian soluble guanylate cyclase activity by adenosine 5'-tetraphosphate, guanosin 5'-tetraphosphate and other nucleotides.
J. Cyclic Nucleotide Res. 2, 337-346 (1976)

37) Ignarro, L.J., Gruetter, C.A.:
Requirement of thiols for activation of coronary arterial guanylate cyclase by glyceryl trinitrate and sodium nitrite - possible involvement of S-nitrosothiols.
Biochim. Biophys. Acta 631, 221-231 (1980)

38) Ignarro, L.J., Kadowitz, P.J., Baricos, W.H.:
Evidence that regulation of hepatic guanylate cyclase activity involves interactions between catalytic site - SH groups and both substrate and activator.
Arch. Biochem. Biophys. 208, 75-86 (1981)

39) Ignarro, L.J., Lippton, H., Edwards, J.C., Baricos, W.H., Hyman, A.L., Kadowitz, P.J., Gruetter, C.A.:
Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: Evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 218, 739-749 (1981)

40) Ignarro, L.J., Wood, K.S., Ballot, B., Wolin, M.S.:
Guanylate cyclase from bovine lung-evidence that enzyme activation by phenylhydrazine is mediated by iron-phenyl hemoprotein complexes.
J. Biol. Chem. 259, 5923-5931 (1984)

41) Ignarro, L.J., Wood, K.S., Wolin, M.S.:
Activation of purified soluble guanylate cyclase by protoporphyrin IX.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 2870-2873 (1982)

42) Ignarro, L.J., Wood, K.S., Wolin, M.S.:
Regulation of purified soluble guanylate cyclase by porphyrins and metalloporphyrins: A unifying concept.
Adv. Cycl. Nucl. Prot. Phosphoryl. Res. 17, 267-274 (1984)

43) Ishikawa, E., Ishikawa, S. Davis, J.W., Sutherland, E.W.:
Determination of guanosine 3',5'-monophosphate in tissues and of guanyl cyclase in rat intestine.
J. Biol. Chem. 244, 6371-6376 (1969)

44) Katsuki, S., Arnold, W., Mittal, C., Murad, F.:
Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine.
J. Cyclic Nucleotide Res. 3, 23-35 (1977)

45) Kimura, H., Mittal, C.K., Murad, F.:
Activation of guanylate cyclase from rat liver and other tissues by sodium azide.
J. Biol. Chem. 250, 8016-8022 (1975)

46) Kimura, H., Murad, F.:
Nonenzymatic formation of guanosine 3':5'-monophosphate from guanosine triphosphate.
J. Biol. Chem. 249, 329-331 (1974)

47) Kimura, H., Murad, F.:
Evidence for two different forms of guanylate cyclase in rat heart.
J. Biol. Chem. 249, 6910-6916 (1974)

48) Kukovetz, W.R., Holzmann, S.:
Mechanism of nitrate-induced vasodilation and tolerance.
Z. Kardiol. 72, Suppl. 3, 14-19 (1983)

49) Kukovetz, W.R., Holzmann, S., Pöch, G.:
Function of cyclic GMP in acetylcholine-induced contraction of coronary smooth muscle.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 319, 29-33 (1982)

50) Kukovetz, W.R., Holzmann, S., Wurm, A., Pöch, G.:
Evidence for cyclic GMP- mediated relaxant effects of nitro-compounds in coronary smooth muscle.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 310, 129-138 (1979)

51) Lad, P.J., Liebel, M.A., White, A.A.:
Activation of rat lung soluble guanylate cyclase by sodium nitroprusside: Effects of hemoglobin and reducing agents.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 629-637 (1981)

52) Laustiola, K., Vuorinen, P., Karp, M., Vapaatalo, H., Metsä-Ketelä, T.:
8-Bromo cyclic GMP inhibits NADH and lactate accumulation in hypoxic rat atria.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 323, 361-363 (1983)

53) Laustiola, K., Vuorinen, P., Vapaatalo, H., Metsä-Ketelä,T.:
Effects of cysteine and nitroglycerin on bovine heart guanylate cyclase and on tissue cyclic GMP and lactate of rat atria.
European J. Pharmacol. 91, 301-304 (1983)

54) Lee, T.P., Kuo, J.F., Greengard, P.:
Role of muscarinic cholinergic receptors in regulation of guanosine 3':5'-cyclic monophosphate content in mammalian brain, heart muscle, and intestinal smooth muscle.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 3287-3291 (1972)

55) Lehotay, D.C. Levy, G.S., Vesely, D.L., Bornet, E.P., Ray, M.V., Entman, M.L., Schwartz, A.:
The effect of adenylate cyclase inhibitor (ACI) on guanylate cyclase, phosphodiesterase and other enzymes in heart.
J. Cyclic Nucleotide Res. 3, 55-65 (1977)

56) Levey, G.S., Lehotay, D.C., Canterburry, J.M., Bricker, L.A., Meltz, G.J.:
Isolation of a unique peptide inhibitor of hormone-responsive adenylate cyclase.
J. Biol. Chem. 250, 5730-5733 (1975)

57) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.:
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

58) McNamara, D.B., Kadowitz, P.J., Hyman, A.L., Ignarro, L.J.:
Adenosine 3',5'-monophosphate formation by preparations of rat liver soluble guanylate cyclase activated with nitric oxide, nitrosyl ferroheme, S-nitrosothiols and other nitroso compounds.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 58, 1446-1456 (1980)

59) Mellion, B.T., Ignarro, L.J., Myers, C.B., Ohlstein, E.H., Balliot, B.A., Hyman, A.L., Kadowitz, P.J.:
Inhibition of human platelet aggregation by S-nitrosothiols - heme-dependent activation of soluble guanylate cyclase and stimulation of cyclic GMP accumulation.
Mol. Pharmacol. 23, 653-664 (1983)

60) Menahan, L.A., Ross, B.D., Wieland, O.:
Studies on the mechanism of fatty acid and glucagon stimulated gluconeogenesis in the perfused rat liver.
In: Staib, W., Scholz, R., (Hrsg.), Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber, S. 142-154, Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1968)

61) Miller, L.L., Bly, C.G., Watson, M.L., Bale, W.F.:
The dominant role of the liver in plasma protein synthesis - a direct study of the isolated perfused rat liver with the acid of lysine -ε-C14.
J. Exp. Med. 94, 431-453 (1951)

62) Mittal, C., Murad, F.:
Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical. A physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4360-4364 (1977)

63) Mülsch, A., Busse, R., Böhme, E.:
Evidence for stimulation of soluble guanylate cyclase by endothelium derived relaxing factor.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 329 Suppl. Abstract 144 (1985)

64) Murad, F., Arnold, W.P., Mittal, C.K., Braughler, J.M.:
Properties and regulation of guanylate cyclase and some proposed functions for cyclic GMP.
Adv. Cyclic Nucleotide Res. 11, 175-204 (1979)

65) Murad, F., Aurbach, G.D.:
Cyclic GMP in metabolism: interrelationship of biogenic amines, hormones and other agents.
In: Freinkel, N. (ed.), The Year in Metabolism, pp. 1-32, Plenum, New York (1977)

66) Murad, F., Mittal, C., Arnold, W.P., Ichihara, K., Braughler, M., El-Zayat, M.:
Properties and regulation of guanylate cyclase: Activation by azide, nitro compounds, and hydroxyl radical and effects of heme containing proteins.
In: Folco, G., Paoletti, R., (eds.), Molecular Biology and Pharmacology of Cyclic Nucleotides, pp. 33-42, Elsevier, Amsterdam (1978)

67) Murad, F., Mittal, C.K., Arnold, W.P., Katsuki, S., Kimura, H.:
Guanylate cyclase: Activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin.
Adv. Cyclic Nucleotide Res. 9, 145-158 (1978)

68) Napoli, S.A., Gruetter, C.A., Ignarro, L.J., Kadowitz, P.J.:
Relaxation of bovine coronary arterial smooth muscle by clyclic GMP, cyclic AMP and analogs.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 212, 469-473 (1980)

69) Needleman, P., Johnson, E.M.:
Mechanism of tolerance development to organic nitrates.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 187, 324-331 (1973)

70) Neer, E.J., Sukiennik, E.A.:
Guanylate cyclase from the rat renal medulla, physical properties and comparison with adenylate cyclase.
J. Biol. Chem. 250, 7905-7909 (1975)

71) Nishikawa, M., Kanamori, M., Hidaka, H.:
Inhibition of platelet aggregation and stimulation of guanylate cyclase by an antianginal agent molsidomine and its metabolites.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 220, 183-190 (1982)

72) Noack, E.:
Investigation on structure-activity relationship in organic nitrates.
Meth. and Find. Exptl. Clin. Pharmacol. 6, 583-586 (1984)

73) Noack, E., Bonn, R., Sandrock, K.:
Beziehungen zwischen chemisch-physikalischen und vasodilatatorischen Eigenschaften organischer Nitrate als Anhalt für ihre Wirksamkeit und Wirkdauer.
In: Köhler, E., Noack, E., Schrey, A., Weiß, M. (Hrsg.), Mononitrat, Dr. C. Wolf und Sohn, München, S. 13 (1983)

74) Noack, E., Schröder, H.:
Differences between the guanylate cyclase stimulatory and vasodilatory potency of organic nitrates.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 325 Suppl., Abstract 2 (1984)

75) Ohlstein, E.H., Wood, K.S., Ignarro, L.J.:
Purification amd properties of heme-deficient hepatic soluble guanylate cyclase: Effects of heme and other factors on enzyme activation by NO, NO-heme and protoporphyrin IX.
Arch. Biochem. Biophys. 218, 187-198 (1982)

76) Popescu, L.M., Panoin, C., Hinescu, M., Nutu, O.:
The mechanism of cGMP-induced relaxation in vascular smooth muscle.
European J. Pharmacol. 107, 393-394 (1985)

77) Rapoport, R.M., Draznin, M.D., Murad, F.:
Endothelium-dependent vasodilator- and nitrovasodilator-induced relaxation may be mediated through cyclic GMP formation and cyclic GMP-dependent protein phosphorylation.
Trans. Assoc. Am. Phys. 96, 19-30 (1983)

78) Rapoport, R.M., Murad, F.:
Endothelium dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle: Role of cyclic GMP.
J. Cycl. Nucl. Prot. Phosphoryl. Res. 9, 281-296 (1983)

79) Rapoport, R.M., Murad, F.:
Effect of cyanide on nitrovasodilator-induced relaxation, cyclic GMP accumulation and guanylate cyclase activation in rat aorta.
European J. Pharmacol. 104, 61-70 (1984)

80) Saville, B.:
A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols.
Analyst 83, 670-672 (1958)

81) Senter, P.P., Eckstein, F., Mülsch, A., Böhme, E.:
The stereochemical course of the reaction catalyzed by soluble bovine lung guanylate cyclase.
J. Biol. Chem. 258, 6741-6745 (1983)

82) Schmidt, K., Reich, R., Kukovetz, W.R.:
Stimulation of coronary guanylate cyclase by nicorandil (SG-75) as a mechanism of its vasodilating action.
J. Cycl. Nucl. Prot. Phosphoryl. Res. 10, 43-53 (1985)

83) Schröder, H.:
Die isoliert perfundierte Rattenleber.
Apothekenmagazin 2, 4-9 (1984)

84) Schultz, G.:
General principles of assays for adenylate cyclase and guanylate cyclase activity.
Methods Enzymol. 38, 115-125 (1974)

85) Schultz, G., Böhme, E., Munske, K.:
Guanyl cyclase: Determination of enzyme activity.
Life Sci. Part II Biochem. Gen. Mol. Biol. 8, 1323-1332 (1969)

86) Schulz, U., McCalla, D.R.:
Reactions of cysteine with
N-methyl-N-nitroso-p-toluenesulfonamide and
N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine.
Can. J. Chem. 47, 2021-2027 (1969)

87) Steiner, A.L., Parker, C.W., Kipnis, D.M.:
The measurement of cyclic nucleotides by radioimmunoassay.
Adv. Biochem. Psychopharmacol. 3, 89-111 (1970)

88) Steiner, A.L., Parker, C.W., Kipnis, D.M.:
Radioimmunoassay for cyclic nucleotides.
J. Biol. Chem. 247, 1106-1113 (1972)

89) Steurer, G., Schütz, W.:
Guanylate cyclase stimulation by nitro-compounds is dependent on free Ca .
Experientia 40, 970-971 (1984)

90) Takayanagi, J., Hisayama, T., Kotsugai, T.:
Activation of guanylate cyclase as secondary reaction following increase in intracellular Ca ion concentrations.
Japan. J. Pharmacol. 31, 831-834 (1981)

91) Tsai, S.C., Adamitz, R., Manganiello, V.C., Vaughan, M.:
Reversible inactivation of soluble liver guanylate cyclase by disulfides.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 100, 637-643 (1981)

92) Tsai, S.-C., Manganiello, V.C., Vaughan, M.:
Purification of guanylate cyclase from rat liver supernatant.
J. Biol. Chem. 253, 8452-8457 (1978)

93) Tu, S.-I., Byler, D.M., Cavanaugh, J.R.:
Nitrite inhibition of acyl transfer by coenzyme a via the formation of an S-nitrosothiol derivative.
J. Agric. Food Chem. 32, 1057-1060 (1984)

94) Waldman, S.A., Rapoport, R.M., Murad, F.:
Atrial natriuretic factor selectively activates particulate guanylate cyclase and elevates cyclic GMP in rat tissues.
J. Biol. Chem. 259, 14332-14334 (1984)

95) Waldmann, S.A., Sinacore, M.S., Lewicki, J.A., Chang, L.Y., Murad, F.:
Selective activation of particulate guanylate cyclase by a specific class of porphyrins.
J. Biol. Chem. 259, 4038-4042 (1984)

96) Walter, U.:
Cyclic-GMP-regulated enzymes and their possible physiological functions.
Adv. Cycl. Nucl. Prot. Phosphoryl. Res. 17, 249-266 (1984)

97) West, T.S.:
Complexometry with EDTA and related agents p. 144, 3rd edn., BDH Chemicals Ltd., Poole (1969)

98) White, A.A., Aurbach, G.D.:
Detection of guanyl cyclase in mammalian tissues.
Biochim. Biophys. Acta 191, 668-697 (1969)

99) Winquist, R.J., Faison, E.P., Waldman, S.A., Schwartz, K., Murad, F., Rapoport, R.M.:
Atrial natriuretic factor elicits an endothelium-independent relaxation and activates particulate guanylate cyclase in vascular smooth muscle.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 7661-7664 (1984)

LEBENSLAUF

Geboren:	9. Dezember 1958 in Remscheid
Eltern:	Ernst Schröder, Bankkaufmann Anneliese Schröder geb. Windgaßen, Optikerin
Schulbildung:	
1965 - 1968	Daniel-Schürmann-Schule Remscheid
1968 - 1977	Ernst-Moritz-Arndt-Gymnasium Remscheid
14. Juni 1977	Reifeprüfung
Pharmaziestudium:	
Oktober 1977 - April 1981	Universität Düsseldorf
Pharmaziepraktikum:	
Mai 1981 - Oktober 1981	Landesanstalt für Lebensmittel-, pharmazeutische und gerichtliche Chemie Berlin
November 1981 - April 1982	Mohrenapotheke Remscheid
5. Mai 1982	Pharmazeutische Prüfung
2. Juni 1982	Approbation
September 1982	Beginn der vorliegenden Arbeit
Sonstige Tätigkeiten:	
Januar 1983 - Dezember 1984	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Rahmen des Sonderforschungs-bereiches 200
seit Januar 1985	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmakologie der Universität Düsseldorf